



**Universidad de Sevilla**  
**Departamento de Estomatología**  
**Facultad de Odontología**

**ESTUDIO CLÍNICO PROSPECTIVO  
CONTROLADO A DOBLE CIEGO SOBRE LA  
PREVENCIÓN DE LA GINGIVITIS CON  
SUPLEMENTO NUTRICIONAL A BASE DE  
PROANTOCIANIDINAS OLIGOMÉRICAS**

**TESIS DOCTORAL**  
**ROSA MARÍA DÍAZ SÁNCHEZ**  
**Sevilla, 2018**





Departamento de Estomatología  
Facultad de Odontología



Medalla y Encomienda  
Orden Civil de Sanidad

D. DANIEL TORRES LAGARES, Catedrático de la Universidad de Sevilla adscrito al Departamento de Estomatología, y D. JOSÉ MARÍA DELGADO MUÑOZ, Profesor Ayudante Doctor del Departamento de Estomatología de la Universidad de Sevilla, en calidad de directores del Proyecto de Tesis de la Licenciada en Odontología D<sup>a</sup>. ROSA MARÍA DÍAZ SÁNCHEZ.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado “ESTUDIO CLÍNICO PROSPECTIVO CONTROLADO A DOBLE CIEGO SOBRE LA PREVENCIÓN DE LA GINGIVITIS CON SUPLEMENTO NUTRICIONAL A BASE DE PROANTOCIANIDINAS OLIGOMÉRICAS”, presentado por D<sup>a</sup>. Rosa María Díaz Sánchez ha sido realizado bajo nuestra dirección, siendo conforme para su presentación como Tesis Doctoral, cumpliendo todos los requisitos para optar al grado de Doctor.

Sevilla, 11 de septiembre de 2018

Prof. Daniel Torres Lagares

Prof. José María Delgado Muñoz



A mis personas favoritas, mis padres José Manuel  
y Rosa, mi hermano Alejandro y mi mitad Álvaro,  
porque hacéis de mí la persona que soy, porque  
celebráis mis logros y alegrías como propias y  
porque cada día me ayudáis a cruzar nuevas metas.

Esta tesis doctoral es de todos nosotros.

Mamá, gracias por todos esos días de insistencia  
y los buenos ratos en los descansos. Siempre  
nos quedarán las jirafas.



# AGRADECIMIENTOS

A **Daniel Torres Lagares** porque además de mi tutor y director de tesis, profesor e investigador incansable, es la persona que me ha ayudado a abrir todas las puertas de las que hoy dispongo en el mundo de la Cirugía Bucal y en la Odontología. Gracias por tu apoyo, tu tiempo y dedicación.

A **José María Delgado Muñoz**, codirector de esta tesis doctoral, por enseñarme como profesional y como persona.

A **José Luis Gutiérrez Pérez**, profesional en múltiples ámbitos y en todos admirable. Gracias por toda la ayuda prestada personal y profesional.

A **Álvaro de Paz Carrión**, mi pareja y mi apoyo, por todas las horas que me has ayudado de múltiples maneras a realizar este trabajo y por todos los ánimos que me has dado en los momentos difíciles, siempre intentando allanarme el camino.

A **mis padres y mi hermano**, por darme todo el cariño y apoyo para poder alcanzar ésta y otras muchas metas que han llegado o están por llegar. Mi motivación y mi alegría son el orgullo que os provocan mis pasos.

A **Miguel Ángel Monjas y Pilar Martínez Aguayo** por poner el toque de arte y color en todos los pasos que doy desde que nos conocemos.

Al **Equipo de Cirugía Bucal de Sevilla**, mi equipo, que desde el año 2009 se convirtió en mi gran familia profesional.

A **mis compañeros y amigos** del mundo de la Odontología y a todos aquellos que han estado a mi lado hasta este momento, porque la unión hace la fuerza. Gracias por escuchar, calmar y aconsejar cuando lo he necesitado.

A **LACER S.A.** por posibilitar y financiar este proyecto de investigación.





## ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN .....	14
2. INTRODUCCIÓN .....	20
2.1. ANATOMÍA PERIODONTAL.....	20
2.2. ENFERMEDADES DEL TEJIDO PERIODONTAL .....	38
2.3. ÍNDICES GINGIVALES Y PERIODONTALES .....	74
2.4. BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA DE LOS TEJIDOS GINGIVALES. ....	90
2.5. COLOR. PROPIEDADES Y SISTEMAS DE MEDICIÓN. ....	96
2.6. PROANTOCIANIDINAS OLIGOMÉRICAS .....	100
3. OBJETIVOS .....	114
4. MATERIAL Y MÉTODO .....	118
4.1. TIPO DE ENSAYO Y RESUMEN DEL DISEÑO DEL ESTUDIO .....	118
4.2. SELECCIÓN DE LOS SUJETOS .....	121
4.3. TRATAMIENTO A SEGUIR .....	123
4.4. DESARROLLO DEL ENSAYO Y EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA	126
4.5. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS .....	129
4.6. ACONTECIMIENTOS ADVERSOS .....	138
4.7. ASPECTOS ÉTICOS.....	138
4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	140
5. RESULTADOS.....	144
5.1. COMPARACIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.....	144
5.2. ÍNDICES GINGIVALES DE LÖE Y SILNESS, DE SANGRADO Y DE	

PLACA EN LA SEGUNDA VISITA (14 DÍAS TRAS EL COMIENZO DEL TRATAMIENTO).....	146
5.3. ÍNDICE GINGIVAL DE LÖE Y SILNESS, DE SANGRADO Y DE PLACA EN LA TERCERA VISITA (21 DÍAS TRAS EL COMIENZO DEL TRATAMIENTO).....	146
5.4. LUMINOSIDAD O BRILLO GINGIVAL.....	148
5.5. ESTUDIO DE IL6 EN EL FLUIDO CREVICULAR.....	149
6. DISCUSIÓN .....	152
6.1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.....	153
6.2. EVIDENCIA BÁSICA MEDIANTE ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> Y RELACIÓN CON NUESTROS RESULTADOS.....	157
6.3. APLICACIONES CLÍNICAS Y LÍNEAS FUTURAS. ....	166
7. CONCLUSIONES.....	170
8. BIBLIOGRAFIA .....	172
ANEXOS .....	214

# RESUMEN

# 1.RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar la respuesta de los tejidos periodontales al consumo de un nuevo suplemento nutricional que contiene proantocianidinas oligoméricas (OPCs) en sustitución de gingivitis inducida tras 21 días de consumo y cese del cepillado.

**Material y Método:** Ensayo clínico prospectivo, controlado, randomizado, a doble ciego, llevado a cabo sobre 20 pacientes divididos en grupo experimental y control. Se realizaron tres visitas durante el estudio: una visita inicial y dos revisiones, a los 14 y 21 días, para recoger los datos de índice gingival de Löe y Sillness, de sangrado gingival, de placa, nivel del interleucina 6 (IL-6) en el fluido crevicular y cambios en el brillo gingival. Los pacientes debían mantener un comprimido a base de OPCs en el grupo de estudio y placebo en el grupo control hasta su total disolución en boca cada noche, no pudiendo llevar a cabo medidas de higiene adicionales durante los 21 días del estudio.

**Resultados:** El índice Gingival de Löe y Sillness fue mayor en el grupo control que en el grupo experimental, llegando a existir una diferencia del doble entre ambos grupos ( $p < 0,0001$ ). Este dato es también corroborado por el índice de sangrado gingival ( $p < 0,005$ ). Sin embargo, el índice de placa en la superficie del diente fue mayor en un 33% en el grupo experimental ( $p < 0,006$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el brillo de la encía entre ambos grupos. Sólo se identificaron algunas diferencias en los valores referidos a la cantidad de IL-6 en el líquido crevicular durante el período de estudio ( $p < 0,0001$ ).

**Conclusión:** Las OPCs tienen un efecto real en la salud de los tejidos periodontales en las condiciones experimentales estudiadas, ya que el índice de sangrado y el índice gingival de Löe y Sillness fueron menores en el grupo de

estudio que en el grupo control. Sin embargo, no se encontró una disminución en la acumulación de placa en la superficie dental en el grupo experimental frente al grupo control. Son necesarios más estudios para determinar la naturaleza de dicha placa.



## ABSTRACT

**Aim:** To evaluate the effectiveness on tissue response in the consumption of the new nutritional supplement made of oligomeric proanthocyanidins in the situation of induced gingivitis after 21 days of use and removal of tooth brushing.

**Material and Methods:** A double-blind randomized controlled prospective clinical trial was carried out on 20 patients; it is divided into an experimental and a control group after fulfilling the selection criteria. Patients had to come three times during the study to register the Löe and Sillness Index, the Gingival Bleeding Index, the Plaque Index, the inflammatory crevicular fluid study (IL6) and the changes in brightness of the gingiva. No complementary hygiene methods were allowed during the 21 days.

**Results:** The Löe and Sillness Index were higher in the control group than in the experimental group, reaching a twofold difference between both groups ( $p < 0.0001$ ). The Gingival Bleeding Index also supports this fact, since the bleeding was lower in the experimental group ( $p < 0.005$ ). However, the dental plaque on the tooth surface according to the Plaque Index was 33% higher in the experimental group ( $p < 0.006$ ). Only some differences in the values were referred in the quantity of IL-6 in the crevicular fluid during the period of the study ( $p < 0.0001$ ).

**Conclusion:** Oligomeric proanthocyanidins have an effect on the periodontal tissue's health under the experimental conditions studied. No effects on the accumulation of plaque on the tooth surface were found. Further studies are needed to determine the nature of the plaque.



# INTRODUCCIÓN

## 2.INTRODUCCIÓN

Las enfermedades periodontales han afectado a la población humana desde los comienzos de la vida. Existen hallazgos de dichas afectaciones periodontales en personas pertenecientes a las civilizaciones antiguas y relatos que hablan del conocimiento de esta patología, así como de su tratamiento.<sup>1-12</sup>

El término “periodonto” proviene del latín *peri*, «alrededor de», y el griego *odus*, «diente».<sup>1-7</sup> Desde las primeras civilizaciones, pasando por todas las etapas históricas, podemos encontrar referencias a la enfermedad periodontal, a su etiología y al tratamiento de la misma. Sin embargo, no sería hasta el siglo XVIII con la publicación del libro *El Cirujano Dentista* en 1728 por el padre de la odontología moderna Pierre Fauchard cuando se recogerían los aspectos de la práctica de la periodoncia, con una explicación detallada del tratamiento de las enfermedades periodontales, así como de los instrumentos necesarios para llevarlos a cabo.<sup>1-13</sup>

### 2.1. ANATOMÍA PERIODONTAL.

La periodoncia es el estudio del periodonto o estructura de soporte de los dientes. El periodonto agrupa los tejidos que rodean al diente y lo anclan al maxilar, proporcionando el apoyo necesario para mantener los dientes en función.<sup>1-4</sup>

La estructura del periodonto involucra a los siguientes tejidos blandos y duros:

- Hueso alveolar.
- Encía.

- Ligamento periodontal (estructura de fijación del tejido conjuntivo)
- Cemento radicular.

### 2.1.1. COMPONENTES DE LA ENCÍA

La encía es parte del tejido blando bucal que cubre la porción coronal de los procesos alveolares de los maxilares y rodea al cuello de los dientes apenas coronal a la unión amelocementaria.<sup>1-4</sup>

La encía se divide anatómicamente en:

- a) Encía libre, marginal o no adherida.
- b) Encía insertada o adherida.
- c) Encía interdental o interproximal.
- d) El surco gingival.

#### a) La encía libre

La encía libre es aquella que está en contacto, pero no unida, a la superficie del diente y se continúa apicalmente con la encía insertada.

Esta encía puede ser separada de la superficie del diente mediante una sonda periodontal. Representa el borde de encía que rodea a los dientes a modo de collar y sigue las ondulaciones de la superficie vestibular y lingual, siendo conocida la parte más apical del festón gingival marginal como cénit.<sup>1-4,13-15</sup>

En casi la mitad de los casos, se encuentra separada de la encía insertada por el surco gingival libre, siendo, con cerca de un un milímetro de ancho en condiciones de salud, la pared del tejido blando del surco gingival. Está unida al diente en la base del surco mediante el epitelio de unión.<sup>1-4,13-15</sup>

### **b) La encía adherida**

La encía adherida es la continuación, en sentido apical, de la encía libre y se extiende hasta la línea mucogingival. Está firmemente unida al cemento y al hueso alveolar subyacente. La altura (o dimensión apicocoronar) es variable de unas personas a otras y dependiendo de los dientes oscila entre uno y nueve milímetros, hallándose mayor cantidad de encía insertada en los incisivos y menor cantidad en caninos y premolares. Es más estrecha en la dentición temporal que en la definitiva. En condiciones de salud presenta una superficie a modo de punteado de piel de naranja que no aparece en la encía libre o marginal. <sup>1-4,13,16-18</sup>

El *ancho de la encía insertada* es un parámetro clínico importante y comprende la distancia que hay entre la unión mucogingival y el fondo del surco gingival. No debe confundirse con el *ancho de encía queratinizada* porque éste incluye también a la encía marginal. <sup>1-4,13,16-18</sup>

### **c) La encía interdental o interproximal**

La encía interproximal o interdental es aquella que ocupa el espacio interproximal situado apicalmente al área de contacto dental. Puede ser piramidal o con forma de collado. Consta de dos papilas, una vestibular y otra lingual y una depresión que conecta ambas papilas y se adapta a la forma del área de contacto interproximal.<sup>1-4,19</sup> Las puntas de las papilas interdetales y los bordes laterales están formadas por la encía marginal los dientes adyacentes. Si hay un diastema la encía se une al hueso interdental y forma una superficie sin papila interdental.<sup>1-4,19</sup>

#### **d) El surco gingival**

El surco gingival es un espacio virtual poco profundo alrededor del diente. En sentido horizontal, está situado entre el diente y el epitelio interno de la encía marginal. En sentido vertical se extiende desde la parte más coronal del epitelio de unión hasta el margen de la encía libre. Tiene forma de V y apenas permite la entrada de una sonda periodontal, siendo la determinación de esta profundidad del surco con esta sonda un importante parámetro de diagnóstico. La profundidad de un surco gingival clínicamente normal en el ser humano está entre dos y tres milímetros.<sup>1-4, 20-23</sup>

#### **2.1.2. EPITELIO GINGIVAL**

El epitelio gingival está compuesto de un revestimiento continuo de epitelio escamoso estratificado. Se pueden definir tres áreas desde el punto de vista morfológico y funcional: epitelio bucal o externo, epitelio del surco y epitelio de unión.

Los queratinocitos son las principales células del epitelio gingival. Otras células presentes en el epitelio gingival son las células de Langerhans, las células de Merkel y los melanocitos.

La función principal del epitelio es proteger las estructuras profundas, permitiendo un intercambio selectivo con el medio ambiente bucal a partir de la diferenciación y proliferación de los queratinocitos.<sup>1-4</sup>

### 2.1.3. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y METABÓLICAS DEL EPITELIO GINGIVAL

Cada componente epitelial de la encía (epitelio bucal, epitelio del surco y epitelio de unión) tienen variaciones morfológicas regionales que ponen de manifiesto la adaptación del tejido al diente y al hueso alveolar. El epitelio bucal y el epitelio del surco tienen en gran medida una función protectora. El epitelio bucal cubre la cresta alveolar con un espesor del 0,2 y 0,3 mm. Se encuentra queratinizado o paraqueratinizado y distribuido en cuatro capas: estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso y estrato córneo. El grado de queratinización disminuye con la edad y con la menopausia y no es uniforme en toda la cavidad oral, existiendo áreas más queratinizadas como el paladar y menos como la mucosa yugal. <sup>1,24-31</sup>

El epitelio bucal contiene queratinas K1, K2 y K10 a K12 en áreas ortoqueratinizadas. También encontramos K6 y K16, K5 y K14. Las áreas paraqueratinizadas expresan K19. El epitelio del surco es un epitelio escamoso estratificado fino, no queratinizado, sin prolongaciones epiteliales. Suele contener muchas células de degeneración hidrópica. Carece de estrato granuloso y córneo, así como de citoqueratinas K1, K2 y K10 a K12, pero si contienen las citoqueratinas tipo esófago K4 y K13. También puede contener K19 y no contiene células de Merkel. <sup>1,24-31</sup>

A pesar de las características morfológicas y químicas. El epitelio del surco tiene potencial para queratinizarse en dos ocasiones:

1. Si es reflejado y expuesto a la cavidad bucal
2. Si la flora bacteriana del surco se elimina por completo.

Sin embargo, el epitelio externo pierde esta queratinización cuando se pone en contacto con el diente, por lo que estos resultados sugieren que la irritación local del surco previene la queratinización sulcular. <sup>1,24-31</sup>

El epitelio del surco es importante porque puede actuar como membrana semipermeable a través de la cual los productos bacterianos pasan a la encía y el líquido de la encía pasa al surco. Sin embargo, este epitelio no es muy permeable a los leucocitos neutrófilos polimorfonucleares (PMN) <sup>1,24-31</sup>.

El epitelio de unión es una banda de epitelio escamoso estratificados no queratinizado. El número de capas de espesor aumenta con la edad y aunque la formación del mismo originariamente se da por la confluencia del epitelio bucal y el epitelio reducido del esmalte durante la erupción, éste último no es esencial, ya que se restaura completamente tras una cirugía, instrumentación de bolsa o alrededor de un implante. En el epitelio de unión sano pueden encontrarse numerosos PMN en migración, dándose un aumento considerable de los mismos en caso de acumulación de placa o inflamación gingival.

Debido a las características estructurales y funcionales del epitelio de unión se puede afirmar que contribuye a prevenir que la flora bacteriana patógena colonice la superficie dental subgingival mediante diferentes mecanismos:

1. La inserción firme con la superficie del diente, formando una barrera física contra las bacterias de la placa.
2. Permite el paso de líquido gingival, células inflamatorias y defensa inmunológica del huésped al surco gingival.
3. Rápida renovación que contribuye al equilibrio entre huésped y colonizador, así como a la rápida reparación del tejido dañado.

#### 2.1.4. LIQUIDO CREVICULAR

El fluido gingival es un trasudado o exudado que contiene amplia gama de factores bioquímicos, los cuales pueden usarse como biomarcadores diagnósticos y pronósticos del estado del periodonto. Fue descrito en el siglo XIX, pero no fue hasta los años cincuenta cuando fueron revelados sus mecanismos defensivos y composición por Waerhaug y Krasse.<sup>32</sup>

El fluido gingival contiene componentes del tejido conjuntivo, epitelio, células inflamatorias, suero y bacterias de la flora microbiana que habitan en el surco.<sup>1,30,33-</sup>

35

Cuando el surco está sano, la cantidad de fluido crevicular es baja, sin embargo, cuando existe inflamación, esta cantidad aumenta, así como el número de componentes antiinflamatorios.<sup>1,30,33-35</sup>

El líquido crevicular tiene funciones tales como retirar el material del surco, mejorar la adhesión del epitelio al diente, propiedades antimicrobianas y aportación de anticuerpos para defender a la encía.

Los componentes del líquido crevicular pueden ser de naturaleza celular, como bacterias, células epiteliales descamadas y leucocitos; electrolitos como potasio, sodio, calcio; compuestos orgánicos como hexosamina, ácido hialurónico, glucosa, ácido láctico, urea, hidroxapatita, endotoxinas, sustancias citotóxicas, sulfuro de hidrógeno y factores antibacterianos; también se han identificado enzimas como metaloproteinasas, interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 y 8, ciclooxigenasa, procolágeno III, etc.<sup>1,30,33-35</sup>.

Debido a la composición del líquido crevicular, es posible detectar respuestas celulares y humorales en individuos sanos y con enfermedades

periodontales. La respuesta celular inmune incluye la aparición de citoquinas, pero no hay evidencia de la relación de la misma y la enfermedad. Sin embargo, la IL-1 $\beta$  y la interleucina-1 alfa (IL-1 $\alpha$ ) aumentan su unión a los polimorfonucleares (PMN). De igual manera, cuando los monocitos/macrófagos se unen a las células endoteliales, provocan la producción de prostaglandinas E2, la liberación de enzimas lisosomales y la estimulación de la reabsorción ósea.<sup>1,30,33-35</sup>.

### **2.1.5. LIGAMENTO PERIODONTAL**

El ligamento periodontal se compone de estructuras de fijación compuesta por tejido conjuntivo altamente celular y un complejo vascular que rodea la raíz del diente y que lo conecta a la pared interna del hueso alveolar.<sup>1-4</sup> Se comunica con los espacios de la médula a través de canales vasculares en el hueso. El ancho del ligamento periodontal es variable, pero tiene aproximadamente 0.2 mm de media, disminuyendo en dientes donde no hay función y aumentando en dientes donde hay hiperfunción.<sup>1-4,36</sup>

Las fibras periodontales están situadas entre la superficie radicular del diente y el hueso alveolar. Se componen de fibras de tejido conectivo, células, vasos, nervios y sustancia fundamental. En una superficie de cemento de 1 mm<sup>2</sup> se insertan un promedio de 28.000 haces fibrosos.<sup>1-4,36</sup>

#### **2.1.5.1. Composición del ligamento periodontal**

Las fibras principales del ligamento periodontal son de naturaleza colagenosa, están organizadas en haces y siguen un curso ondulado. Los haces de fibras consisten en fibras individuales que forman una red continua y

anastomosada entre diente y hueso. Las porciones terminales de los haces que se insertan en diente y hueso se conocen como fibras de Sharpey y una vez ancladas en la pared del alveolo o en el diente estas fibras se calcifican de forma significativa, existiendo en su composición proteínas no colágenas como la osteopontina o sialoproteína ósea que contribuyen a la regulación de la mineralización y la cohesión tisular en los sitios con aumento de tensión biomecánica. <sup>1,33,37-39</sup>.

El colágeno es una proteína compuesta de diversos aminoácidos como la hidroxiprolina, glicina, prolina y la hidroxilisina. El colágeno es el responsable de mantener el armazón, resistencia, flexibilidad y el tono del tejido. Es producido por los fibroblastos, condroblastos, odontoblastos y otras células. Existen diferentes tipos de colágeno. Las fibras principales se componen en su mayoría de colágeno tipo I, mientras que las reticulares se componen de colágeno tipo III. El colágeno tipo IV se encuentra en la lámina basal y el tipo VI también se ha aislado en el ligamento periodontal y en la encía. <sup>1,32,37-39</sup>

Las fibras de ligamento periodontal se organizan en seis grupos a lo largo de la raíz en desarrollo. <sup>1,32,37-39</sup>

- **Grupo transeptal:** Las fibras transeptales se extienden interproximalmente sobre la cresta del hueso alveolar y están incluidas en el cemento del diente adyacente. Estas fibras pertenecen a la encía porque no tienen inserción ósea y se reconstruyen incluso tras la destrucción del hueso alveolar ocasionado por la enfermedad periodontal.
- **Grupo de la cresta alveolar:** Las fibras de la cresta alveolar se extienden desde el cemento debajo del epitelio de unión hasta la cresta alveolar, así como desde el cemento sobre la cresta alveolar hasta la capa fibrosa del

periostio en sentido oblicuo. Estas fibras previenen la extrusión del diente y resisten los movimientos laterales.<sup>39</sup>

- **Grupo horizontal:** Las fibras horizontales se extienden en sentido perpendicular al eje mayor del diente desde el cemento hasta el hueso alveolar.
- **Grupo oblicuo:** Las fibras oblicuas es el grupo más grande en el ligamento periodontal. Se extienden desde el cemento en dirección coronal y en sentido oblicuo respecto al hueso. Son las fibras encargadas de mantener la carga del estrés masticatorio vertical y transformarlo en tensión sobre el hueso alveolar. <sup>1,37-39</sup>
- **Grupo apical:** Las fibras apicales están irradiadas desde el cemento hasta el hueso en la región apical del alveolo de forma irregular. Sólo se encuentran en raíces que están completamente formadas.
- **Grupo interradicular:** Las fibras interradiculares sólo se encuentran en forma de abanico desde el cemento hasta el tabique interradicular en las áreas de la furca de dientes multirradiculares.

Entre los grupos principales de fibras se encuentran fibras colágenas con una organización menos regular con vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. Se ha descrito una red elástica en el ligamento periodontal compuesta por muchas laminillas de elastina con fibras de oxitalán y de elaunina, que se cree que son las encargadas de regular el flujo vascular.

Además de las fibras descritas anteriormente existen fibras colágenas asociadas a las fibras principales extendiéndose en todas direcciones formando un plexo llamado *plexo de fibras indiferentes*.<sup>1,33,37-39</sup>

Además de las fibras tratadas anteriormente, se han descrito cuatro tipos de células que se encuentran en el tejido periodontal: <sup>1,40-46</sup>

- **Células de tejido periodontal.** Fibroblastos, cementoblastos, cementoclastos, osteoblastos y osteoclastos. Los fibroblastos son los encargados de generar nuevo colágeno y fagocitar fibras de colágenos para asegurar la renovación de las mismas.
- **Células epiteliales en reposo.** Los llamados restos epiteliales de Malassez forman un entramado en el ligamento periodontal y aparecen como cúmulos aislados de células o cordones entrelazados. Los restos epiteliales se distribuyen a lo largo del cemento de los dientes, siendo más numerosos en el área apical y cervical. Su número va disminuyendo con la edad y van convirtiéndose en cementículos.
- **Células del sistema inmunológico.** Incluye neutrófilos, linfocitos, macrófagos, mastocitos y eosinófilos.
- **Células asociadas con los elementos neurovasculares.**

Por último, en el ligamento periodontal podemos encontrar entre las fibras y las células, *sustancia fundamental*. La sustancia fundamental se compone de agua (70%), glicosaminoglicanos (ácido hialurónico y proteoglicanos) y glicoproteínas (fibronectina y laminina).<sup>1,40-46</sup>

#### 2.1.5.2. Funciones del ligamento periodontal

Las funciones del ligamento periodontal se clasifican en físicas, de formación y remodelación y nutricional y sensitiva.

## 1. Funciones físicas. <sup>1,47-53</sup>

- a. Protección de los vasos sanguíneos y nervios mediante un tejido blando de lesiones por fuerzas mecánicas.
- b. Transmisión de fuerzas oclusales al hueso. Cuando hay una fuerza axial, hay una tendencia a desplazar la raíz en el alveolo. Las fibras oblicuas onduladas toman su máxima longitud y sostienen la mayor parte de la fuerza axial.
- c. Unión del diente al hueso.
- d. Conservación de los tejidos gingivales en relación adecuada con los dientes.
- e. Resistencia al impacto de las fuerzas oclusales (amortiguación). Para llevar a cabo esta función, se han descrito dos teorías, la *teoría tensional*, la cual defiende que las fibras principales del ligamento periodontal son el principal factor en el apoyo del diente y transmiten las fuerzas al hueso y la *teoría viscoelástica*, la cual indica que el desplazamiento dentario es controlado por movimientos de fluidos y que las fibras tienen un papel secundario en esta función.

## 2. Función de formación y remodelación. <sup>1,54-60</sup>

Las células del ligamento periodontal participan en la formación y reabsorción de cemento y hueso que se dan cuando hay movimiento dentario fisiológico, en la acomodación del periodonto a las fuerzas oclusales o en la reparación de lesiones. El ligamento periodontal está en

remodelación constante. Las fibras y células viejas se descomponen y las sustituyen otras nuevas. Los fibroblastos forman nuevo colágeno y las células mesenquimales residuales se convierten en osteoblastos y cementoblastos.

### **3. Función nutricional y sensitiva.** <sup>1,61-66</sup>

El ligamento periodontal aporta nutrientes al cemento, hueso y encía mediante vasos sanguíneos y linfáticos. Es un tejido muy vascularizado en relación con otros ligamentos del cuerpo humano. Además, el ligamento periodontal se encuentra altamente innervado con fibras nerviosas sensitivas capaces de transmitir sensaciones táctiles, de presión y dolor por vías del nervio trigémino. Los vasos sanguíneos, linfáticos y nervios forman un paquete vasculonervioso que entra en los alveolos por la porción más apical y viajan por el hueso a través de canales.

#### **2.1.6. CEMENTO**

El cemento es el tejido mesenquimal calcificado y avascular que forma la cubierta exterior de la raíz anatómica. <sup>1,45,67-77</sup>

Las dos fuentes principales de fibras de colágeno en el cemento son las fibras de Sharpey (extrínsecas), que son la porción incluida de las fibras principales del ligamento periodontal formadas por fibroblastos, y las fibras de la matriz del cemento (intrínsecas), producidas por los cementoblastos.

Los cementoblastos también forman los componentes no colágenos de la sustancia fundamental interfibrilar como los proteoglicanos, glicoproteínas y fosfoproteínas. La mayor proporción de la matriz orgánica de un cemento está

compuesta por colágeno tipo I (90%) y tipo III (5%). Las fibras de Sharpey están compuestas sobre todo por colágeno tipo I y a su vez, éste se encuentra recubierto por el colágeno tipo III.

El cemento tiene una porción celular y otra acelular. El cemento acelular es el primer cemento en formarse, cubre el tercio cervical o la mitad de la raíz y no contiene células. Este cemento se crea antes que el diente alcance el plano oclusal y su espesor va de 30 a 230  $\mu\text{m}$ . Las fibras de Sharpey forman la mayor parte del cemento acelular y tiene un papel principal en el apoyo del diente. La mayoría se insertan casi en ángulo recto a la superficie radicular y penetran profundamente en el cemento. El cemento acelular también contiene fibrillas intrínsecas de colágeno calcificadas y organizadas de manera irregular o paralelas a la superficie. El cemento celular se forma una vez que el diente alcanza el plano oclusal, es más irregular y contiene células (cementocitos) en espacios lagunares que se comunican entre sí mediante un sistema de canalículos anastomosados. El cemento celular está menos calcificado y contiene menos fibras de Sharpey. Ambos tipos de cemento, celular y acelular, se organizan en láminas separadas por líneas incrementales paralelas al eje longitudinal de la raíz.<sup>1,45,67-77</sup>

El cemento radicular es, por un lado, parte del diente y por otro parte del periodonto. Se diferencian los siguientes tipos celulares y acelulares.<sup>1-4,78-79</sup>

- 1. Cemento afibrilar acelular (CAA).** No contiene células ni fibras colágenas intrínsecas o extrínsecas, excepto sustancia fundamental mineralizada. Es un producto de los cementoblastos y se encuentra como cemento coronal en humanos, con espesor de 1 a 15  $\mu\text{m}$ .

2. **Cemento de fibras ajenas acelular (CFAA).** Está compuesto casi en su totalidad por haces densamente compactados de fibras de Sharpey y carece de células. Es producto de fibroblastos y cementoblastos y se encuentra en el tercio cervical de las raíces de humanos, pero se puede extender apicalmente. Su espesor es de 30 a 230  $\mu\text{m}$ .
3. **Cemento de fibras propias celular (CFPC).** Contiene células pero no fibras extrínsecas de colágeno. Se forma por cementoblastos y en los humanos se encuentran rellenando las lagunas de reabsorción.
4. **Cemento de fibras mixtas celular (CFMC).** Se compone de fibras extrínsecas (de Sharpey) e intrínsecas y puede contener células. Es producido por los fibroblastos y cementoblastos y en los humanos aparece en tercio apical de raíces y en furca. Tiene un espesor de 100 a 1000  $\mu\text{m}$ .

El contenido inorgánico del cemento (hidroxiapatita,  $\text{Ca}^{10}[\text{Po}^4]_6[\text{OH}]_2$ ) es del 45 al 50%, inferior al hueso (65%), esmalte (97%) o dentina (70%) y no se ha establecido ninguna relación entre el envejecimiento y la cantidad de contenido mineral. <sup>1,80-81</sup>.

Los extractos de proteínas del cemento maduro promueven la inserción y la migración celular y estimulan la síntesis de proteínas de los fibroblastos gingivales y las células del ligamento periodontal. Se han descrito algunas moléculas que se encuentran únicamente en el cemento, como una proteína colágena derivada de este tejido llamada *Proteína de Inserción del Cemento (CAP)*. Esta proteína ha demostrado promover la adhesión y propagación de tipos de células mesenquimales, así como de los osteoblastos y fibroblastos del ligamento

periodontal, que muestran mejor adhesión que los fibroblastos y queratinocitos gingivales. También se ha descrito el *Factor de Crecimiento derivado del Cemento*, el cual es una molécula parecida al factor de crecimiento insulínico tipo I y que ha demostrado aumentar la proliferación de fibroblastos gingivales y células del ligamento periodontal. <sup>1,82</sup>

### 2.1.7. EL HUESO ALVEOLAR

El hueso alveolar es la porción del maxilar o mandíbula que alberga a los alveolos dentarios. Estos alveolos aparecen cuando el diente erupciona y desaparecen gradualmente cuando el diente se pierde. Por lo tanto, el proceso alveolar se desarrolla, se remodela y se reabsorbe en función de la estructura dentaria. <sup>1-4,83</sup>

El proceso alveolar consta de: <sup>84</sup>

- Lámina externa de hueso cortical formada por hueso haversiano y láminas óseas.
- Pared alveolar interna. Se observa como lámina dura radiográficamente. En el aspecto histológico se compone de lámina cribiforme por la que los haces neurovasculares unen el ligamento periodontal con el hueso trabecular.
- Hueso trabecular. Se compone de trabéculas esponjosas entre dos capas compactas.

La mandíbula además incluye el hueso basal, que es la porción más apical de la misma que no está relacionada con los dientes. <sup>1-4,83-84</sup>

El hueso alveolar es el menos constante de los tejidos periodontales debido a que su estructura está en constante cambio. La reabsorción y formación de hueso

están reguladas por influencias locales (requisitos funcionales de los dientes y edad de las células óseas) y sistémicas (influencia hormonal). El remodelado puede afectar a su densidad, altura y contorno.<sup>1-4,84</sup>

El perfil óseo se adapta a las prominencias de las raíces. La altura y el espesor de las tablas vestibular y lingual se ven afectadas por la alineación de los dientes y la angulación de las raíces respecto al hueso. En ocasiones una vestibulización excesiva de la raíz ocasiona una tabla vestibular excesivamente fina o incluso inexistente, quedando la raíz desnuda de hueso y solamente cubierta por periostio y encía. Cuando la raíz es muy convexa y el hueso interproximal se encuentra muy deprimido, se crean dos niveles diferentes en sentido anteroposterior.<sup>4</sup>

En condiciones normales, en un diente totalmente erupcionado, la distancia que existe entre la cresta del hueso y la línea amelocementaria es de aproximadamente un milímetro y medio, variando esta distancia con la edad.<sup>1-4</sup>

En los espacios interproximales del sector anterior, el hueso alveolar existente es más estrecho y más fino. En presencia de inflamación desaparece más rápidamente que en las zonas interproximales posteriores, donde puede dar lugar a una variedad de defectos óseos.<sup>1-4</sup>

#### **2.1.7.1. Composición del hueso alveolar**

El hueso alveolar se forma por osificación intramembranosa y consta de una matriz calcificada con osteocitos dentro de unos espacios llamados lagunas. Esto osteocitos forman una red a través de la matriz ósea intercelular mediante canalículos por los que se anastomosan y aportan oxígeno y nutrientes, a la vez

que recogen los residuos metabólicos. Los osteoblastos son las células que producen la matriz orgánica del hueso. Éstos provienen de células foliculares pluripotentes. La matriz depositada por los osteoblastos se llama osteoide (no mineralizado), cuando el nuevo osteoide se deposita, el más antiguo ubicado por debajo de la superficie se mineraliza.<sup>1,52,85-88</sup>

La irrigación del hueso por parte de los vasos sanguíneos se lleva a cabo por el periostio (capa de tejido conjuntivo osteogénico diferenciado que se encuentra en la superficie externa del hueso) y el endostio (capa de tejido conjuntivo osteogénico diferenciado que se encuentra en la superficie interna del hueso). Además, existen mecanismos internos que aportan un suministro vascular en huesos demasiado gruesos donde el periostio no es capaz de nutrir todo el espesor llamados osteonas. Éstas se encuentran sobre todo en las placas corticales externas y el hueso alveolar.<sup>1,52,85-88</sup>

El hueso alveolar consta de una parte inorgánica compuesta por calcio, fosfato, hidróxido, carbonato, citrato e iones como sodio, magnesio y flúor. Las sales minerales se encuentran en forma de cristales de hidroxiapatita. La parte orgánica consta de colágeno tipo I (90%), con otras proteínas no colágenas en menor cantidad como la osteocalcina, osteonectina, proteínas morfogenéticas óseas, fosfoproteínas y proteoglicanos.<sup>1,52,85-88</sup>

## 2.2. ENFERMEDADES DEL TEJIDO PERIODONTAL

Las enfermedades del tejido periodontal son motivo de constante revisión debido a la constante investigación que se lleva a cabo en este campo. El 22 de junio de 2018 con motivo del congreso europeo de periodoncia Europerio9 celebrado en Ámsterdam se presentó la nueva clasificación de las enfermedades periodontales por parte de la *American Academy of Periodontology (AAP)* y la *European Federation of Periodontology (EFP)*, actualizando la clasificación vigente hasta este momento emitida en 1999 en el *Workshop for the Classification of Periodontal Disease* llevado a cabo en este año (Tablas 1,2 y 3).<sup>89-111</sup>

Las enfermedades del periodonto son diversas tal y como podemos observar en las tablas anteriores. Las enfermedades más comunes son la gingivitis asociada a la placa (inflamaciones de la encía sin pérdida de la inserción) y la periodontitis (atrofia del periodonto debida a inflamación).<sup>89-111</sup>

La *gingivitis* se limita a los tejidos blandos supracrestales marginales, los cuales se inflaman, pero no tiene pérdidas de inserción. En la nueva clasificación se recoge la diferencia entre la presencia de inflamación gingival en uno o más puntos a diferencia de un caso de gingivitis. Esta patología se puede dar en un diente sin pérdida de inserción o con pérdida de inserción previa (por enfermedad periodontal controlada y tratada con éxito) que desarrolla gingivitis, sin causar un agravamiento de la pérdida de inserción. Se manifiesta clínicamente por sangrado durante el sondaje del *sulcus* gingival, y en casos graves por enrojecimiento e hinchazón, especialmente en la zona de las papilas.<sup>1-4,89,91-93</sup>

CLASIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES Y ENFERMEDADES PERIODONTALES Y PERI-IMPLANTARIAS		
Enfermedades y condiciones periodontales	Salud periodontal, enfermedades y condiciones gingivales	Salud periodontal y gingival
		Gingivitis inducida por placa dental
		Gingivitis no inducida por placa dental
	Periodontitis	Enfermedad periodontal necrotizante
		Periodontitis
		Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas
	Otras condiciones de afectación periodontal	Enfermedades o condiciones sistémicas que afectan al soporte del tejido periodontal
		Abscesos periodontales y lesiones endo-perio
		deformidades y condiciones mucogingivales
		Trauma oclusal
Factores relacionados con los dientes y las prótesis		
Enfermedades y condiciones implantarias	peri-	Salud peri-implantaria
		Mucositis peri-implantaria
		Peri-implantitis
		Deficiencia de tejido blando y duro peri-implantario

Tabla 1. Clasificación de las condiciones y enfermedades periodontales y peri-implantarias según la AAP y EFP emitida en junio de 2018.<sup>89</sup>

SALUD PERIODONTAL, CONDICIONES Y ENFERMEDADES GINGIVALES		
Salud periodontal y gingival	Salud clínica gingival en periodonto intacto	
	Salud clínica gingival en periodonto reducido	Paciente con periodontitis estables
		Paciente sin periodontitis
Gingivitis inducida por placa dental	Sólo asociada con placa dental	
	Mediada por factores de riesgo sistémicos o locales	
	Agrandamiento gingival influenciado por el uso de drogas o fármacos	
Enfermedades gingivales no inducida por placa dental	Trastornos genéticos o del desarrollo	
	Infecciones específicas	
	Condiciones inmunes e inflamatorias	
	Procesos reactivos	
	Neoplasmas	
	Enfermedades endocrinas, nutricionales o metabólicas	
	Lesiones traumáticas	
	Pigmentación gingival	

Tabla 2. Clasificación de salud periodontal, condiciones y enfermedades gingivales según la AAP y EFP emitida en junio de 2018.<sup>89</sup>

La *periodontitis* se define como “enfermedad inflamatoria de los tejidos de soporte de los dientes provocada por microorganismos o grupos de microorganismos específicos, que tienen como resultado la destrucción progresiva del ligamento periodontal y el hueso alveolar, formando bolsas periodontales, recesiones o ambas”.<sup>1,89,94-105</sup> Se produce cuando la inflamación de la encía afecta a las estructuras más profundas del aparato de sostén dental. Tiene lugar entonces la desintegración del colágeno y la reabsorción ósea

(pérdida de inserción). El epitelio de unión se transforma en un epitelio de bolsa que prolifera apical y lateralmente. Se forma así una bolsa que constituye un refugio y depósito de bacterias patógenas oportunistas que mantienen la periodontitis y pueden favorecer el avance de la afección. Aunque diferentes tipos de inflamación pueden ser características de un diagnóstico específico, posiblemente la inflamación per se no es un diagnóstico en sí mismo. Más específicamente, la presencia clínica o la ausencia de una respuesta inflamatoria no deben considerarse necesariamente como un signo de enfermedad o salud. Es evidente que la placa dental (un biofilm microbiano) causa inflamación gingival, y la extensión y gravedad de la inflamación están influenciadas por diversas condiciones sistémicas y factores orales en esta etapa. Además, la placa se acumula más rápidamente en los sitios gingivales inflamados que en los sitios no inflamados, creando una dinámica compleja entre la biopelícula de la placa dental y la respuesta inmunoinflamatoria del huésped.<sup>1,89,94-105</sup>

Debe notarse que las exacerbaciones de la respuesta inflamatoria en la encía, ya sea debido a biopelículas patógenas o modificadas por fluctuaciones en las secreciones de hormonas esteroideas sexuales, pueden representar respuestas protectoras de un individuo tanto en ambientes locales como sistémicos mediante la destrucción, dilución y aislamiento de los organismos invasores.<sup>1,89,94-105</sup> Sin embargo, la ausencia de signos clínicos de inflamación puede no excluir la presencia de un proceso inflamatorio continuo evidente a nivel histológico. Por ejemplo, durante el tabaquismo, la respuesta inflamatoria gingival a la acumulación de placa en los dientes se silenciará, a pesar de los distintos patrones de respuesta del huésped gingival.<sup>94,112,113</sup>

PERIODONTITIS		
Enfermedad periodontal necrotizante	Gingivitis necrotizante	
	Periodontitis necrotizante	
	Estomatitis necrotizante	
Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas		
Periodontitis	Estadíos	Periodontitis inicial
		Periodontitis moderada
		Periodontitis severa con riesgo de pérdida de algún diente
		Periodontitis severa con riesgo de pérdida de la dentición
	Extensión y distribución: localizada, generalizada o afectación incisiva y molar	
Grados	Grado A: Progresión lenta	
	Grado B: Progresión moderada	
	Grado C: Progresión rápida	

Tabla 3. Clasificación de periodontitis según la AAP y EFP emitida en junio de 2018. <sup>89</sup>

El concepto de inflamación gingival no tratada que progresa hacia la destrucción del periodonto ha centrado la atención en la gingivitis inducida por placa y las afecciones gingivales asociadas como parte del espectro de enfermedades periodontales. Aunque este concepto ha sido propagado por estudios clínicos que muestran una asociación entre inflamación gingival y pérdida ósea<sup>90,113</sup>, estudios longitudinales que examinaron la historia natural de la enfermedad periodontal no lograron mostrar la conversión completa de la inflamación gingival de larga duración a periodontitis.<sup>91,111</sup> La inflamación gingival está asociada con la progresión a periodontitis,<sup>91,115-120</sup> sin embargo, la presencia de inflamación gingival no significa que todos los sitios afectados estén destinados a progresar a formas destructivas de enfermedad periodontal.<sup>91,118,119</sup> Las

interrelaciones entre la salud y la gingivitis y la periodontitis son complejas y dependen de una biopelícula simbiótica o disbiótica, de la proporcionalidad de la respuesta inmune inflamatoria del huésped y de su capacidad para resolver la inflamación.<sup>91,121</sup> Hasta la fecha no hay evidencia científica que nos permita diagnosticar qué sitios de gingivitis son susceptibles de progresión a periodontitis. Por lo tanto, para prevenir la pérdida de inserción y la destrucción del tejido periodontal, es esencial lidiar con la gingivitis mediante una intervención terapéutica local apropiada.

## **2.2.1. SALUD PERIODONTAL ENFERMEDADES Y CONDICIONES GINGIVALES**

### **2.2.1.1. SALUD PERIODONTAL**

“La salud es un estado de completo bienestar físico, mental y social, y no simplemente la ausencia de enfermedad o trastorno”.<sup>90,122</sup> En concordancia con esta definición, la salud periodontal puede definirse como un estado libre de inflamación que permita al individuo llevar a cabo una función normal y estar libre de enfermedad inflamatoria periodontal. Esto, a su vez, significa que la ausencia de inflamación asociada con la gingivitis o la periodontitis, según se evalúa clínicamente, es un requisito previo para definir la salud periodontal. Por lo tanto, la salud periodontal puede existir antes del comienzo de la enfermedad o puede restaurarse en un periodonto anatómicamente reducido.<sup>90</sup>

### a) Evidencia de salud histológica

La composición celular del tejido conjuntivo infiltrado en desarrollo se analizó en voluntarios humanos que participaron en un modelo de gingivitis experimental de 21 días en el que se abolieron las prácticas de higiene oral.<sup>90,123</sup> A medida que el índice clínico (índice gingival) para la inflamación aumentó, la densidad volumétrica del tejido conjuntivo infiltrado dentro del tejido conectivo no infiltrado en un área subyacente al epitelio de unión aumentó significativamente y casi de forma lineal.<sup>90,124</sup> El tejido conjuntivo infiltrado demostró un aumento significativo de linfocitos desde la salud hasta la inflamación (17,0% a 29,9%), concomitantemente con una disminución en la densidad numérica de fibroblastos, del 48,1% al 34,9%. Además, la densidad numérica de los leucocitos polimorfonucleares se encontraba entre 20,8% y 22,6% en todas las etapas, desde la salud hasta la gingivitis. Estos resultados indican que un infiltrado inflamatorio subyacente al epitelio de unión siempre está presente en los tejidos gingivales que son clínicamente sanos.<sup>90,124</sup>

Para estudiar la influencia de la salud gingival a largo plazo, se supervisaron cinco higienistas dentales con higiene bucal personal óptima durante seis meses.<sup>90,125</sup> Se aseguró que en todos los tiempos de observación (0, 1, 4, y 6 meses) los índices clínicos de placa e inflamación fueran cercanos a cero. La densidad volumétrica del tejido conectivo infiltrado frente al tejido conjuntivo no infiltrado disminuyó significativamente desde el mes 1 al mes 4. Esto indicó que es necesario un régimen de higiene oral óptimo de larga duración para cualquier mejora histológica del infiltrado inflamatorio. Sin embargo, incluso después de seis meses de prácticas supervisadas de higiene bucal, el infiltrado todavía estaba presente.<sup>90,125</sup>

Mientras que la densidad numérica de los linfocitos dentro del infiltrado disminuyó significativamente, de 18,4% a 5,6%, después de seis meses de meticulosa higiene oral, la densidad numérica de los fibroblastos aumentó significativamente, del 57,7% al 71,0%. Esto refleja claramente un resultado de curación positiva. Sin embargo, debe reconocerse que incluso durante este período de seis meses de higiene oral óptima, la densidad numérica de los leucocitos polimorfonucleares se mantuvo relativamente estable, variando de 20,6% a 17,7%. Esto, a su vez, significa que en los seres humanos un estado de encía clínicamente saludable, incluso durante un período prolongado, siempre se caracteriza histológicamente por un pequeño infiltrado de células inflamatorias.<sup>90,124,125</sup> Esto indica que los leucocitos polimorfonucleares tienen la función de vigilar de forma fisiológica los tejidos periodontales. También se han identificado recientemente linfocitos B de memoria en el tejido periodontal con esta función.<sup>90</sup>

Por lo tanto, el término de salud clínica periodontal representa una entidad que se determina por la ausencia de pérdida de inserción, ausencia de sangrado al sondaje, ausencia de sondaje mayor a 3 mm, ausencia de enrojecimiento, edema y pus. Esta condición está asociada a la vigilancia inmune fisiológica en vez de a la inflamación patológica.<sup>90</sup>

### **b) Determinantes de salud periodontal**

Las enfermedades periodontales ya no pueden considerarse infecciones bacterianas simples, sino más bien, enfermedades de naturaleza multifactorial que implican una interacción entre la microbiota subgingival, las respuestas inmune e inflamatoria del huésped y los factores modificadores o determinantes del

entorno.<sup>126</sup> Por lo tanto, la salud periodontal no debe considerarse únicamente por los niveles de placa/bacteria y control, sino que debe abarcar el estudio de todos los determinantes responsables de la aparición de la enfermedad, así como la restauración y el mantenimiento de la salud.

Es importante reconocer los determinantes de la salud y de la enfermedad periodontal como factores modificadores y predisponentes controlables e incontrolables, siendo su evaluación para cada paciente crucial para alcanzar y mantener la salud periodontal clínica. En este contexto, los factores predisponentes se definen como cualquier agente o afección que contribuye a la acumulación de placa dental (anatomía del diente, posición del diente, restauraciones) y los factores modificadores se definen como cualquier agente o condición que altera la forma en que un individuo responde a la acumulación de placa subgingival (tabaquismo, afecciones sistémicas, medicamentos).

Los determinantes de la salud periodontal se clasifican en tres categorías que se recogen a continuación:<sup>90</sup>

#### 1. Determinantes microbiológicos

- a. **Composición de placa supragingival.** La placa dental es una sustancia estructurada, resistente, de color amarillento-grisáceo que se adhiere vigorosamente a las superficies duras intraorales. La composición principal de la placa dental son microorganismos, los cuales pueden llegar a exceder los  $10^9$  de ellos. La placa supragingival se encuentra en el margen gingival o sobre éste, y suele mostrar una organización estratificada con varias capas de morfotipos bacterianos como los cocos gram-positivo, bacilos

pequeños en la superficie dental, mientras que los bacilos y filamentos gram-negativos y espiroquetas predominan en la superficie externa de la placa.<sup>1-4,90-94</sup>

- b. **Composición del biofilm subgingival.** La flora microbiana subgingival es diferente debido a la disponibilidad de productos sanguíneos y el bajo potencial oxidación-reducción que caracteriza el medio anaerobio, siendo de hecho muchos periodontopatógenos anaerobios.<sup>1-4,90-94</sup>

## 2. Determinantes del huésped

### a. Factores Locales

- i. **Bolsas periodontales.** La existencia de bolsas periodontales previas supone una dificultad en la higienización del paciente para mantener el estado de salud periodontal, ya que supone una zona de fácil acúmulo de colonias bacterianas.<sup>1-4,90-93</sup>
- ii. **Restauraciones dentales.** Las restauraciones mal ajustadas, con aristas o zonas de retención de placa provocan un factor determinante para la salud periodontal de la zona.<sup>1-4,90-93</sup>
- iii. **Anatomía radicular.** La anatomía radicular puede suponer un factor local de salud cuando actúa como lugar de retención de placa. Un ejemplo de esta anatomía es la exposición de furca en molares y premolares, defectos radiculares o invaginaciones.<sup>1-4,90-93</sup>

- iv. **Posición dental y apiñamiento.** La posición dental y el apiñamiento provocan una dificultad añadida para la higienización de la boca del paciente, ya que pueden existir zonas de difícil acceso para retirar la placa dental y provocar por tanto la aparición de colonias bacterianas que pudiesen dar lugar a una bolsa periodontal.<sup>1-4,90-93</sup>
- b. Factores sistémicos
- i. **Sistema inmune del huésped.** Una disminución del sistema inmune del paciente provoca una respuesta insuficiente ante el depósito de placa o colonización bacteriana de ciertas zonas que dificultan el establecimiento o mantenimiento de la salud periodontal.<sup>1-4,90-93</sup>
- ii. **Salud sistémica.** Existen enfermedades sistémicas que tienen repercusión a nivel periodontal, por lo que la existencia de salud sistémica supone un factor importante para la salud periodontal.<sup>1-4,90-111</sup>
- iii. **Genética.** En los últimos años se ha investigado sobre la asociación de la enfermedad periodontal y la herencia genética. Existen algunas enfermedades hereditarias o de origen genético que tiene como parte de su manifestación a la periodontitis agresiva, por ejemplo, el síndrome de Papillon-Lefèvre. Otras anomalías genéticas como el síndrome de Down, el síndrome de Ehlers-Danlos e

hipofosfatemia provocan destrucción periodontal significativa. En la actualidad, no hay evidencia sólida sobre la existencia de un patrón genético que pueda estar ligado absolutamente a la enfermedad periodontal, no obstante, existe una débil conexión con los genes que controlan la producción de la interleucina 1 (IL-1) o con el gen que controla la glicosiltransferasa (GLT6D).<sup>1-4,127-129</sup>

### 3. Determinantes ambientales

- a. **Tabaco.** Estudios clínicos controlados han demostrado que los pacientes fumadores presentan menos inflamación gingival ante la presencia de placa y por lo tanto, menos sangrado al sondaje debido a la disminución del número de vasos sanguíneos, provocando una alteración en la quimiotaxis, fagocitosis y reacciones oxidativas que lleva a un aumento del nivel de patógenos en la placa dental, así como en la colonización de bolsas periodontales.<sup>1-4,81-111,130</sup>
- b. **Medicación.** Existen diferentes fármacos que tiene efecto a nivel gingival, tales como los anticonceptivos orales, bloqueadores de los canales de calcio (nifedipino, verapamilo, diltiazem, amlodipino o felopidino), inmunosupresores (ciclosporinas), antiepilépticos o el valproato de sodio. Todos ellos predisponen a la aparición de enfermedades periodontales, siendo por tanto más complicado el mantenimiento de la salud gingival en pacientes que tomen estos fármacos.<sup>1-4,90-111,131-134</sup>

- c. **Estrés.** Los trastornos psicósomáticos, en particular el estrés, se ha identificado como determinante de la salud periodontal. Ejemplo de este factor es el trastorno conocido como “boca de trinchera” en la que los soldados en condiciones de guerra desarrollaban gingivitis ulcerativa provocada por el estrés. Este trastorno psicósomático también puede provocar alteración del sistema inmune mediante la producción de cortisol por parte de la corteza suprarrenal, el cual provoca una inactivación de los neutrófilos, producción de inmunoglobulina G y secreción salival de inmunoglobulina A, así como el efecto que se puede provocar sobre la respuesta inmune celular a través de un aumento de la liberación de neurotransmisores como la epinefrina, norepinefrina, neurocinina y sustancia P.<sup>1-4,135</sup>
- d. **Nutrición.** La nutrición es un factor determinante de la salud periodontal importante, ya que se han descrito patologías provocadas por deficiencias nutricionales concretas como, por ejemplo, la deficiencia de la vitamina C.<sup>1-4,90-111</sup>

### c) Indicadores de salud periodontal

Existen diferentes indicadores de salud periodontal:<sup>90</sup>

1. Sangrado al sondaje: La ausencia de sangrado al sondaje con una fuerza inferior a 0.25N sugiere ausencia de inflamación gingival.
2. Profundidad de sondaje: Si bien las bolsas poco profundas son identificativas de salud gingival, las bolsas profundas no tienen que

ser necesariamente evidencia de enfermedad, ya que las bolsas profundas pueden permanecer estables y no inflamadas, especialmente en pacientes con tratamiento periodontal exitoso durante un largo periodo de tiempo. Por lo tanto, pueden existir bolsas profundas sanas, lo cual nos lleva a concluir que la profundidad de sondaje por sí solo no es un indicador fiable de salud, sino que hay que mantenerlo en relación con los demás indicadores.

3. Características radiográficas: las características radiográficas de un periodonto normal son lámina dura intacta (tanto lateral como de la cresta alveolar), sin evidencia de pérdida ósea en las áreas de furcación y de una distancia de 2 mm desde la cresta alveolar a la línea amelocementaria (puede variar de 1 a 3 mm en individuos sanos). Este parámetro puede verse afectado con el envejecimiento, tipo de diente, angulación del diente, atrición severa o en casos donde la periodontitis se haya desarrollado y, por definición, se haya perdido hueso debido al proceso inflamatorio. En estos casos las radiografías no constituyen un indicador por sí solas.
4. Movilidad dental: existe movilidad fisiológica del diente y movilidad patológica. Es importante diferenciarlas para que constituya un indicador de salud periodontal. La movilidad no está recomendada como indicador debido a que ésta puede ser una adaptación fisiológica por traumas oclusales, siendo además una situación reversible.

Dentro del apartado de la nueva clasificación llamado "Salud periodontal y

gingival” se establece como estado de salud aquellos pacientes con salud clínica gingival con periodonto reducido por periodontitis estable.<sup>90</sup> La enfermedad periodontal estable se define como un estado en el que la periodontitis ha sido tratada con éxito a través del control de los factores locales y sistémicos, con mínimo sangrado al sondaje, mejoras en la profundidad de sondaje y en los niveles de inserción y falta de destrucción progresiva. También existe el concepto de remisión/control de la enfermedad periodontal, el cual se define como un período en el transcurso de la enfermedad durante el cual el tratamiento ha conseguido la reducción (aunque no en la resolución total) de la inflamación y una mejora en los niveles de profundidad de sondaje y de inserción, pero no un control óptimo factores. Este puede ser un resultado de tratamiento razonable para los individuos con factores modificadores incontrolables.<sup>90</sup>

Tras esta información, podemos establecer cuatro niveles de salud periodontal en función de los indicadores de salud del periodonto (inserción y nivel óseo), así como en la habilidad para controlar los factores modificadores y los resultados relativos al tratamiento:<sup>90</sup>

1. Salud periodontal original: definido como ausencia total de inflamación en periodonto con soporte normal.
2. Salud periodontal clínica: caracterizada por ausencia o niveles mínimos de inflamación clínica en periodonto con soporte normal.
3. Enfermedad periodontal estable: con periodonto reducido y control de los factores modificadores del tratamiento que producen niveles mínimos de inflamación y respuesta óptima al tratamiento. Es el objetivo de todo tratamiento periodontal.

4. Enfermedad periodontal controlada/remitida: con periodonto reducido y sin control de los factores modificadores que provocan una disminución importante de la inflamación y una estabilización en la progresión de la enfermedad.

#### **2.2.1.2. GINGIVITIS INDUCIDA POR PLACA DENTAL**

La gingivitis es una enfermedad inflamatoria de los tejidos de soporte dentales, afectando en primera instancia a la encía. Dicha afectación podría pasar a estadios más avanzados dando lugar a la aparición de periodontitis en la cual dicha inflamación e infección (ya en este caso), lleva a la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes, encía, ligamento periodontal y hueso alveolar<sup>2-7</sup>. La inflamación gingival se considera un requisito previo necesario para el desarrollo posterior de la periodontitis y la pérdida progresiva de inserción alrededor de los dientes.<sup>91,136</sup> El manejo de la gingivitis es por lo tanto una estrategia preventiva primaria clave para la periodontitis y una estrategia preventiva secundaria para la recurrencia de la periodontitis.<sup>91</sup>

La gingivitis más frecuente es aquella desarrollada por acúmulo de placa dental. Incluso cuando los niveles de biopelícula de la placa dental se reducen al mínimo, un infiltrado inflamatorio está presente en los tejidos gingivales como parte de una vigilancia inmune fisiológica. Sin embargo, el inicio de la gingivitis ocurre si la placa dental se acumula durante días o semanas sin interrupción o remoción, debido a una pérdida de simbiosis entre la biopelícula y la respuesta inmunoinflamatoria del huésped, y al desarrollo de una disbiosis incipiente. Diversos factores sistémicos, que incluyen endocrinopatías, afecciones

hematológicas, dieta y medicamentos, pueden modificar la respuesta inmune inflamatoria. La gingivitis asociada con la placa y/o las fluctuaciones hormonales endógenas, las drogas, las enfermedades sistémicas y la malnutrición exhiben varias características esenciales. Las características universales de estas condiciones gingivales incluyen: signos y síntomas clínicos de inflamación que se confinan a la encía libre y adherida y no se extienden más allá de la unión mucogingival; reversibilidad de la inflamación al alterar o eliminar la placa dental; la presencia de una carga alta de placa bacteriana para iniciar y/o agravar la gravedad de la lesión (aunque esto varía entre individuos); y niveles de unión estables en un periodonto, que pueden o no haber experimentado una pérdida de unión o hueso alveolar previo.<sup>91</sup>

En la gingivitis se dan una secuencia de eventos que provocan que podamos dividirla en diferentes etapas: etapa inicial, etapa temprana y etapa establecida. Las diferencias de cada etapa y sus características recogen en la tabla 4.<sup>1</sup>

#### **a) Gingivitis inducida por placa**

La gingivitis inducida por placa es una respuesta inflamatoria de los tejidos gingivales que resulta de la acumulación de placa bacteriana localizada en y debajo del margen gingival.<sup>91,137</sup> No provoca directamente la pérdida de los dientes, sin embargo, es el primer escalón para dar paso a la periodontitis, por lo que constituye como hemos dicho anteriormente el primer escalón preventivo. Los datos muestran que la gingivitis inducida por placa dental es prevalente en todas las edades en población dentada y es considerada la enfermedad del periodonto más común.<sup>91,138-</sup>

142

La placa es un material adherente compuesto de bacterias, moco y residuos de alimentos que se acumula en las áreas expuestas del diente. Si la placa no se elimina, se calcifica y se convierte en un depósito duro denominado sarro (o cálculo) que queda atrapado y retenido en la base del diente. La bacterias y toxinas que se encuentran tanto en la placa como en el sarro irritan las encías, tornándolas muy sensibles. Cuando no existe patología, las encías son levemente sensibles y la exploración de las mismas resulta indolora.<sup>91</sup>

Etapas de la gingivitis						
Etapa	Tiempo (días)	Vasos sanguíneos	Epitelio de unión y del surco	Células inmunes predominantes	Colágeno	Hallazgos clínicos
<b>I. Lesión inicial</b>	2 a 4	Dilatación vascular Vasculitis	Infiltración por parte de los polimorfonucleares (PMN)	PMN	Pérdida perivascular	Flujo de líquido crevicular
<b>II. Lesión temprana</b>	4 a 7 días	Proliferación vascular	Lo mismo que en etapa I Formación de proyecciones interpapilares Áreas atróficas	Linfocitos	Mayor pérdida alrededor del infiltrado	Eritema Hemorragia al sondaje
<b>III. Lesión establecida</b>	14 a 21	Lo mismo que en etapa II, además de estasia sanguínea	Lo mismo que en etapa II, pero más avanzado	Células plasmáticas	Pérdidas continuas	Cambios de color, tamaño, textura, etc.

Tabla 4. Etapas de las gingivitis y sus características.<sup>1</sup>

La gingivitis inducida por placa comienza en el margen gingival y puede diseminarse a través de la encía restante. Los pacientes pueden notar síntomas que incluyen sangrado con cepillado dental, sangre en la saliva, hinchazón y enrojecimiento gingival y halitosis en el caso de formas establecidas como hemos explicado anteriormente.<sup>91,143,144</sup> La intensidad de los signos y síntomas clínicos variará entre individuos, así como entre sitios dentro de una dentición. Los signos clínicos comunes de la gingivitis inducida por placa incluyen eritema, edema, hemorragia, hipersensibilidad y agrandamiento.<sup>91,145,146</sup> La severidad de la gingivitis inducida por placa puede verse influida por la anatomía de los dientes y las raíces, así como por los márgenes de las restauraciones.

Los cambios histopatológicos incluyen el alargamiento de crestas en el tejido conectivo gingival, vasculitis de vasos sanguíneos adyacentes al epitelio de unión, destrucción progresiva de la red de fibras de colágeno con cambios en los tipos de colágeno, alteraciones citopatológicas de fibroblastos residentes y un infiltrado inflamatorio/inmune celular progresivo.<sup>91,147</sup> Aunque estudios recientes sugieren que las bacterias asociadas con la gingivitis son distintas de las asociadas con la salud o la periodontitis,<sup>91,148-151</sup> se necesitan más estudios para definir claramente la comunidad microbiana de la gingivitis. En este sentido, la gingivitis es una enfermedad inflamatoria inducida por una placa dental inespecífica, un concepto que permanece sin cambios desde 1999.

#### **b) Gingivitis asociada al acúmulo de placa en periodonto reducido**

Después del tratamiento periodontal activo y la resolución de la inflamación causada por la periodontitis, el tejido periodontal no está clínicamente inflamado,

pero sí presenta una menor adhesión del tejido conectivo y altura del hueso alveolar. La gingivitis inducida por placa en un periodonto reducido se caracteriza por el retorno de la inflamación inducida bacterianamente al margen gingival en un periodonto reducido sin evidencia de pérdida de unión progresiva (es decir, sin indicación de enfermedad activa). El hallazgo clínico y microbiológico común es la misma gingivitis inducida por la placa en un periodonto completo, excepto por la presencia de pérdida de inserción preexistente y, por lo tanto, un mayor riesgo de periodontitis.<sup>91,142</sup>

### **c) Factores modificadores de la gingivitis inducida por placa**

Existen factores sistémicos que contribuyen a la gingivitis, como cambios hormonales relacionados con la pubertad, menstruación o embarazo o patología de índole endocrina como la diabetes. Estas condiciones sistémicas provocan una reacción exacerbada debido a una respuesta modificada de las funciones celulares e inmunológicas.<sup>91</sup>

- **Placa inducida por exceso de hormonas esteroideas**

La homeostasis dentro del periodonto involucra relaciones endocrinas complejas y multifactoriales. Se han llevado a cabo diferentes estudios sobre la modulación provocada por andrógenos, estrógenos y progestinas en las respuestas de los tejidos dentro del periodonto en diferentes momentos de la vida de una persona. Los niveles elevados de hormonas esteroideas junto con las bacterias de la placa son necesarias para producir una respuesta inflamatoria gingival.<sup>91,153-155</sup> Sin embargo, la composición de la flora bacteriana para que se dé esta condición no ha sido identificada.<sup>91,155</sup>

- **Pubertad**

La incidencia y severidad de la gingivitis en adolescentes es influenciada por numerosos factores, tales como la placa dental, las caries, la respiración oral, el apiñamiento y la erupción dental. Así mismo, también podemos encontrar un aumento dramático en los niveles de hormonas esteroides durante la pubertad que tiene un efecto transitorio sobre el estado inflamatorio de la encía. Aunque la gingivitis asociada a la pubertad tiene muchas de las características clínicas de la gingivitis inducida por placa, es la propensión a desarrollar signos de inflamación gingival en presencia de cantidades relativamente pequeñas de placa durante el período puberal la clave para distinguir esta condición.<sup>91</sup>

- **Ciclo menstrual**

Durante el ciclo menstrual se han documentado cambios inflamatorios significativos y observables en la encía.<sup>91,156,157</sup> Sin embargo, la mayoría de los estudios clínicos han demostrado que solo hay cambios inflamatorios modestos que pueden observarse durante la ovulación.<sup>91,157-160</sup> Se ha demostrado que el flujo de fluido crevicular gingival aumenta al menos un 20% durante la ovulación en más del 75% de las mujeres analizadas<sup>161</sup>, y otros estudios también han mostrado un cambio modesto en mujeres con inflamación periodontal preexistente<sup>162-164</sup>. Estos datos no son extensibles a todas las mujeres, ya que sí existe una cohorte muy pequeña de mujeres que son extremadamente sensibles a los cambios hormonales en la encía durante el ciclo menstrual, la mayoría de las mujeres con inflamación gingival asociada al ciclo menstrual presentarán signos clínicamente no detectables de la condición.<sup>91,161-164</sup>

- **Embarazo**

Durante el embarazo la prevalencia y gravedad de la gingivitis es elevada y con frecuencia no están relacionadas con la cantidad de placa presente <sup>90,122,163-166</sup>. Las características de la gingivitis asociada al embarazo son similares a la gingivitis inducida por placa, exceptuando que la propensión a desarrollar gingivitis es mayor en presencia de cantidades pequeñas de placa dental. El embarazo también es una condición que puede asociarse a la aparición de granulomas piógenos. <sup>91,123,165-168</sup>

- **Anticonceptivos orales**

Las características de la gingivitis asociada con anticonceptivos orales en mujeres premenopáusicas son similares a la gingivitis inducida por placa, excepto la propensión a desarrollar signos de inflamación gingival en presencia de cantidades relativamente pequeñas de placa. Las concentraciones de los anticonceptivos orales actuales son mucho más bajas que las dosis originales que se informaron en los estudios clínicos iniciales, por lo que las formulaciones actuales no inducen los cambios clínicos en la encía que se informaron con anticonceptivos de dosis alta. <sup>91,169</sup>

#### **d) Gingivitis por placa exacerbada por condiciones sistémicas**

La hiperglucemia, las neoplasias malignas hematológicas y las deficiencias de nutrientes son una colección notablemente diversa de estados sistémicos que pueden afectar los tejidos gingivales. En condiciones sistémicas específicas, como hiperglucemia, leucemias agudas y/o deficiencia de vitamina C, las bacterias de la placa son necesarias para producir una respuesta gingival. <sup>91</sup>

- **Hiperglucemia**

La gingivitis es una característica que se encuentra en niños con diabetes mellitus tipo I mal controlada, y el nivel de control glucémico puede ser más importante para determinar la gravedad de la inflamación gingival que la calidad del control de la placa. En adultos con diabetes mellitus es mucho más difícil detectar los efectos de esta enfermedad endocrina en las enfermedades gingivales.<sup>91,170,171</sup>

- **Leucemia**

Las manifestaciones orales se han descrito principalmente en la leucemia aguda y consisten en linfadenopatía cervical, petequias y úlceras de la mucosa, así como inflamación y agrandamiento gingival.<sup>91,172</sup> Los signos de inflamación en la encía incluyen tejidos hinchados, vidriados y esponjosos que son de color rojo a púrpura.<sup>91,173</sup> El sangrado gingival es un signo común en pacientes con leucemia y es el signo oral inicial en el 17,7% (leucemia aguda) y el 4,4% (leucemia crónica) de los pacientes.<sup>91,172</sup> El sangrado se debe a la trombocitopenia y deficiencias del factor de coagulación que puede presentarse en estados preleucémicos como signo inicial.<sup>91,174</sup> También se ha informado de un agrandamiento gingival, que inicialmente comienza en la papila interdental seguida por la encía marginal y adherida.<sup>91,172-174</sup> El agrandamiento es causado por la infiltración en la encía de células leucémicas.<sup>91,174</sup> Aunque los irritantes locales pueden predisponer a exacerbar la respuesta gingival en la leucemia, no son un requisito previo para que se formen lesiones en la cavidad oral.<sup>91,173</sup>

- **Tabaco**

Los estudios epidemiológicos han revelado que fumar es uno de los factores de riesgo ambientales más importantes relacionados con el estilo de vida para la

enfermedad periodontal.<sup>91,175</sup> Tanto los efectos locales como los sistémicos del humo del cigarrillo deben considerarse como factor de riesgo. El humo del cigarrillo inhalado se absorbe de los vasos capilares a través del epitelio alveolar pulmonar y entra en la circulación general, mientras que la exposición directa del humo del cigarrillo inhalado a los tejidos periodontales provoca vasoconstricción de la microcirculación periodontal y fibrosis gingival.<sup>91,176</sup> La acumulación de placa y la progresión de la enfermedad se exacerban en los fumadores, sin embargo, los fumadores tienen menos signos y síntomas clínicos de inflamación gingival por la vasoconstricción provocada y, por lo tanto, fumar puede enmascarar la enfermedad.<sup>91,177</sup>

- **Malnutrición**

El papel preciso de la nutrición en el inicio o la progresión de las enfermedades periodontales aún no se ha dilucidado, lo que conduce a una escasez de información disponible sobre los efectos de casi todas las deficiencias nutricionales en los tejidos periodontales humanos. La única deficiencia nutricional que tiene efectos bien documentados en el periodonto implica el agotamiento de ácido ascórbico en plasma (es decir, vitamina C).<sup>91,178,179</sup> Aunque el escorbuto es inusual en áreas con un suministro adecuado de alimentos, ciertas poblaciones con dietas restringidas (niños de familias con bajo nivel socioeconómicas, ancianos institucionalizados y alcohólicos) corren el riesgo de desarrollar esta afección.<sup>91,180</sup> La necesidad de ácido ascórbico en la dieta para tener salud periodontal es un hecho,<sup>91,178,179,181</sup> por lo que es objeto de nuestro trabajo el estudio de la asociación de este compuesto con las proantocianidinas oligoméricas en la prevención de las enfermedades periodontales, ya que en ausencia de escorbuto establecido,

detectar niveles bajos de ácido ascórbico es complicado<sup>91,182</sup> y cuando se detecta, por lo general tiene características que son similares a la gingivitis inducida por placa.

### **e) Gingivitis por placa exacerbada por factores orales**

El inicio y el progreso de la inflamación gingival pueden modificarse o exacerbarse por diversos factores orales (locales).<sup>91</sup>

- **Márgenes de restauraciones subgingivales prominentes.**

La convexidad subgingival y el margen de una restauración son muy importantes en el control de placa específico del sitio y están estrechamente relacionados con la salud gingival.<sup>91,183</sup> Los márgenes prominentes de restauraciones subgingivales promueven la gingivitis al aumentar la acumulación local de placa bacteriana. Por lo tanto, los márgenes de restauración subgingival deben diseñarse cuidadosamente para minimizar la retención de placa.

- **Hiposalivación**

La xerostomía es un síntoma causado por una pérdida percibida de saliva en la cavidad oral. Por lo tanto, el término "hiposalivación" se emplea aquí como un término de diagnóstico. Se sabe que algunas afecciones/enfermedades como el síndrome de Sjögren, la ansiedad y la diabetes mal controlada pueden causar xerostomía debido a la hiposalivación.<sup>91,184,185</sup> Es importante destacar que se observa con frecuencia como un efecto secundario de medicamentos como antihistamínicos, descongestionantes, antidepresivos y antihipertensivos. La hiposalivación puede causar caries dentales progresivas, trastornos del gusto, halitosis e inflamación de la mucosa oral, la lengua y la encía.<sup>91,186,187</sup> La sequedad

en la boca puede dificultar el control de la placa y la inflamación gingival puede empeorar.

- **Agrandamiento gingival por fármacos**

El agrandamiento gingival inducido por medicación es cada día más frecuente, debido a que la lista de fármacos que provocan este efecto va en aumento. En esta lista se encuentran fármacos anticonvulsivos como la fenitoína o el valproato de sodio, inmunosupresores como la ciclosporina, bloqueantes de los canales del calcio como el nifedipino, verapamilo, diltiazem, amlodipino o felodipina, así como también se ha relacionado el agrandamiento gingival con la toma por parte de mujeres premenopáusicas de anticonceptivos orales a dosis altas.<sup>91,188-190</sup> Para condiciones gingivales influenciadas por fármacos, es necesaria la combinación de las bacterias de la placa junto con el medicamento para producir una respuesta gingival. Sin embargo, no todas las personas que toman estos medicamentos desarrollarán agrandamiento de los tejidos gingivales, lo que sugiere una susceptibilidad que requiere características específicas.<sup>91,191</sup> Además, algunos pacientes con agrandamiento gingival influenciado por fármacos no presentan gingivitis evidente en los sitios afectados.

Las características clínicas comunes de los agrandamientos gingivales influenciadas por fármacos incluyen variaciones en los patrones de agrandamiento entre pacientes teniendo en cuenta factores como la predisposición genética,<sup>91,189</sup> una tendencia a ocurrir más a menudo en la encía anterior, una mayor prevalencia en grupos de menor edad,<sup>91,192-194</sup> una aparición tras tres meses de uso que generalmente se observa por primera vez en la papila, y, aunque se puede encontrar en un periodonto con o sin pérdida ósea, no se asocia con la pérdida de

inserción del diente.<sup>91,192-195</sup>. Finalmente, todos estos fármacos producen lesiones clínicas y características históricas que no se distinguen entre sí.

### **2.2.1.3. GINGIVITIS NO INDUCIDA POR PLACA DENTAL**

Mientras que la gingivitis inducida por placa es una de las enfermedades inflamatorias humanas más comunes, varias enfermedades gingivales no inducidas por placa son menos comunes, pero a menudo de mayor importancia para los pacientes. Las lesiones gingivales no inducidas por placa son a menudo manifestaciones de afecciones sistémicas, pero también pueden representar cambios patológicos limitados a los tejidos gingivales.<sup>92</sup>

Tal y como se ha expuesto ya en el presente trabajo, con motivo de la celebración del Europerio9 en Ámsterdam se ha presentado también la nueva clasificación de las enfermedades gingivales no inducidas por placa dental, en la cual se procede a la creación de una nomenclatura más completa y la inclusión de códigos diagnósticos ICD-10 para diferenciarse de la clasificación hasta el momento vigente propuesta en 1999. La clasificación emitida por Holmstrup y cols. se recoge en la tabla 5.<sup>92</sup>

### **2.2.2. PERIODONTITIS**

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial asociada con las biopelículas de placas disbióticas y caracterizada por la destrucción progresiva del aparato de soporte de los dientes. Sus características principales incluyen la pérdida de soporte de tejido periodontal, que se manifiesta a través de la pérdida de inserción clínica y la pérdida ósea alveolar evaluada

radiográficamente, la presencia de bolsas periodontales y hemorragia gingival. La periodontitis es un importante problema de salud pública debido a su alta prevalencia; puede ocasionar pérdida de dientes, afectar negativamente la función masticatoria y la estética, ser una fuente de desigualdad social y afectar la calidad de vida.<sup>95-101</sup>

La periodontitis se dividía según la última clasificación aceptada en 1999 en las siguientes categorías:<sup>100</sup>

- Periodontitis crónica, que representa las formas de enfermedad periodontal destructiva que generalmente se caracterizan por una progresión lenta.
- Periodontitis agresiva, un grupo de formas de periodontitis altamente destructivas que afecta principalmente a individuos jóvenes, incluyendo afecciones clasificadas anteriormente como "periodontitis de inicio temprano" y "periodontitis de progresión rápida".
- Periodontitis como manifestación de enfermedad sistémica, un grupo heterogéneo de afecciones patológicas sistémicas que incluyen la periodontitis como manifestación.
- Enfermedades periodontales necrosantes, un grupo de condiciones que comparten un fenotipo característico en el que la necrosis de los tejidos gingivales o periodontales es una característica destacada.
- Abscesos periodontales, una entidad clínica con distintas características de diagnóstico y requisitos de tratamiento.

Sin embargo, aunque esta clasificación ha sido ampliamente utilizada durante los últimos 17 años, tiene numerosas deficiencias. El objetivo del grupo de

trabajo establecido para publicar y actualizar la nueva calcificación este año ha tenido como objetivo incorporar nuevos conocimientos con respecto a la epidemiología, etiología y patogénesis para poder proponer así una clasificación con parámetros actualizados. Se ha adoptado un nuevo esquema de clasificación de periodontitis, en el que las formas de la enfermedad previamente reconocidas como "crónicas" o "agresivas" se agrupan ahora en una sola categoría ("periodontitis") y se caracterizan en función de un sistema multidimensional de estadificación y clasificación. La estadificación depende en gran medida de la gravedad de la enfermedad en la presentación y de la complejidad del tratamiento de la enfermedad, mientras que la clasificación proporciona información complementaria sobre las características biológicas de la enfermedad, incluido un análisis basado en la historia de la tasa de progresión de periodontitis; evaluación del riesgo de mayor progresión; análisis de posibles malos resultados del tratamiento; y evaluación del riesgo de que la enfermedad o su tratamiento pueda afectar negativamente a la salud general del paciente.<sup>95-101</sup>

Las enfermedades periodontales necrotizantes, cuyo fenotipo clínico característico incluye características típicas (necrosis papilar, hemorragia y dolor) y se asocian con alteraciones de la respuesta inmunitaria del huésped, siguen siendo una categoría distinta de periodontitis.<sup>89,95,99,100</sup>

Las lesiones endodónticas-periodontales, definidas por una comunicación patológica entre los tejidos pulpares y periodontales en un diente dado, se presentan de forma aguda o crónica, y se clasifican de acuerdo con los signos y síntomas que tienen un impacto directo en su pronóstico y tratamiento.

ENFERMEDADES Y CONDICIONES GINGIVALES NO INDUCIDAS POR PLACA			
Enfermedades genéticas o del desarrollo	Fibromatosis hereditaria gingival		
Infecciones específicas	Origen bacteriano	Enfermedad periodontal necrotizante	
		<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (Gonorrea)	
		<i>Treponema pallidum</i> (Sífilis)	
		<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
		Gingivitis estreptocócica	
	Origen viral	Virus <i>coxsackie</i> (Enfermedad mano-pie-boca)	
		Herpes simplex 1 y 2 (Primario o recurrente)	
		Virus <i>varicella-zoster</i>	
		<i>Molluscum contagiosum</i> virus	
		Virus del papiloma humano (papiloma de células escamosas, condiloma acuminado, verruga vulgar, hiperplasia epitelial focal)	
	Origen fúngico	Candidiasis	
		Otras micosis (Histoplasmosis, aspergillosis)	
	Condiciones y lesiones inflamatorias y autoinmunes	Reacciones de hipersensibilidad	Alergia de contacto
			Gingivitis de células plasmáticas.
Eritema multiforme.			
Enfermedades autoinmunes de la piel y de las membranas mucosas		Pénfigo vulgar	
		Penfigoide	
		Liquen plano	
		Lupus eritematoso	
Condiciones inflamatorias granulomatosas		Enfermedad de Crohn	
		Sarcoidosis	
Procesos reactivos o epuloides	Épulis fibroso		
	Granuloma fibroblástico calcificante		
	Granuloma piógeno		
	Granuloma periférico de células gigantes		

Neoplasmas	Premaligno	Leucoplasia
		Eritroleucoplasia
	Maligno	Carcinoma de células escamosas
		Leucemia
Linfoma		
Enfermedades endocrinas, nutricionales y metabólicas	Deficiencias vitamínicas	
	Deficiencia de vitamina C	
Lesiones traumáticas	Lesiones mecánicas	Queratosis friccional
		Ulceración provocada por cepillado dental
		Autolesiones
	Lesiones químicas	Ácido
		Ácido acetilsalicílico
		Cocaína
		Peróxido de Hidrógeno
		Dentífricos
		Paraformaldehidos o hidróxido de calcio
	Quemaduras	
Pigmentación Gingival	Melanoplaquia	
	Melanosis del fumador	
	Pigmentación inducida por fármacos	
	Tatuaje de amalgama	

Tabla 5. Enfermedades y condiciones gingivales no inducidas por placa.<sup>92</sup>

Los abscesos periodontales se definen como lesiones agudas caracterizadas por acumulación localizada de pus dentro de la pared gingival de la bolsa o surco periodontal, destrucción rápida del tejido y se asocian con riesgo de diseminación sistémica.<sup>95,100</sup> Las revisiones hasta el momento del estado de la cuestión se recogen en las tablas 6 y 7.<sup>100</sup>

Estado periodontal		Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio IV
Severidad	Pérdida de inserción clínica interproximal	1 a 2 mm	3 a 4 mm	Más de 5mm	Más de 5mm
	Pérdida ósea radiográfica	Tercio coronal (menos del 15%)	Tercio coronal (del 15 al 33%)	≥ De la mitad del tercio coronal	≥ De la mitad del tercio coronal
	Pérdida de dientes	Sin pérdida de dientes debido a la periodontitis		≤4 dientes perdidos por periodontitis	≥5 dientes perdidos por periodontitis
Complejidad	Local	Profundidad de sondaje máxima de 4 mm	Profundidad de sondaje máxima de 5 mm	Además de la complejidad del Estadio II:	Además de la complejidad del Estadio III:
		Pérdida ósea horizontal	Pérdida ósea horizontal	Profundidad de sondaje ≥6mm Pérdida ósea vertical ≥3mm Defecto de Furca Clase II o III Defecto moderado cresta	Necesidad de rehabilitación compleja debido a: Disfunción masticatoria Traumatismo oclusal secundario (grado de movilidad dental ≥2) Defecto severo de la cresta y colapso de la mordida Menos de 20 dientes (10 pares opuestos)
Extensión y distribución	Para cada etapa, se describe la extensión como patrón localizado (<30% de los dientes afectados), generalizado o patrón de afectación molar/incisivo.				

Tabla 6. Clasificación de la periodontitis basada en etapas definidas por la gravedad (según el nivel de pérdida de inserción clínica interdental, pérdida ósea radiográfica y pérdida de dientes), complejidad y extensión y distribución.<sup>100</sup>

Grado de periodontitis			Grado A:	Grado B:	Grado C:
			Baja tasa de progresión	Tasa moderada de progresión	Alta tasa de progresión
Criterios primarios	Evidencia directa de la progresión	Datos longitudinales (Pérdida radiográfica o pérdida ósea de inserción clínica)	Sin evidencia de pérdida en los último 5 años	Menos de 2mm de pérdida en los últimos 5 años	Más de 2 mm de pérdida en los últimos 5 años
		% Pérdida de hueso/Edad	<0.25	0.25 a 1.0	>1.0
		Fenotipo	Gran depósito de placa con niveles bajos de destrucción	Destrucción acorde con el depósito de placa	Destrucción excede la expectativa según los depósitos de placa; clínica específica de patrones de rápida progresión y/o inicio temprano de la enfermedad
Factores modificadores		Tabaco	No fumadores	< de 10 cigarrillos al día	≥ de 10 cigarrillos al día
		Diabetes	Glucemia normal/ NO diagnóstico de diabetes	Hemoglobina glicosilada (HbA1c) <7% en pacientes con diabetes	HbA1c ≥7% en pacientes con diabetes

Tabla 7. Clasificación de la periodontitis según los grados que reflejan las características biológicas de la enfermedad, incluida la evidencia o el riesgo de progresión rápida, respuesta anticipada al tratamiento y efectos sobre la salud sistémica.<sup>100</sup>

Otros de los puntos a actualizar son las enfermedades necrotizantes periodontales. Éstas se caracterizan por tres características clínicas típicas (necrosis papilar, hemorragia y dolor) y se asocian con la respuesta inmune del huésped y algunas deficiencias, que deberían considerarse en la clasificación de estas condiciones (Tabla 8).<sup>100</sup>

Las lesiones endodónticas-periodontales se definen como una patología comunicante entre la pulpa y los tejidos periodontales en un diente dado, se presentan de forma aguda o forma crónica, y debe clasificarse según sus signos y síntomas, los cuales tienen un impacto directo en su pronóstico y tratamiento. Estos signo o síntomas son la presencia o ausencia de fracturas, perforaciones y presencia o ausencia de periodontitis (Tabla 9).<sup>95,100</sup>

Categoría	Pacientes	Condiciones predisponentes	Condición clínica
Enfermedad periodontal necrotizante crónica	Adultos	VIH+/SIDA con recuento de CD4 <200 y carga viral detectable	Gingivitis necrotizante (GN) Periodontitis necrotizante (PN)
		Otras condiciones sistémicas severas (Inmunosupresión)	Estomatitis necrotizante (EN)
		Niños	Malnutrición severa
		Condiciones de vida extremas	
		Múltiples infecciones (virales)	
Enfermedad periodontal necrotizante en pacientes comprometidos temporal o moderadamente	En pacientes con gingivitis	Factores no controlados: Estrés, nutrición, tabaco y hábitos	GN generalizada. Posible progresión a PN.
		PN previa con cráteres residuales	
		Factores locales: Proximidad de las raíces, malposición dentaria	GN localizada. Posible progresión a PN.
	En pacientes periodontales	Factores comunes predisponentes para PN	GN. Progresión infrecuente. PN. Progresión infrecuente.

Tabla 8. Clasificación de Enfermedades Periodontales Necrotizantes (EPN).<sup>100</sup>

Los abscesos periodontales ocurren con mayor frecuencia en bolsas periodontales preexistentes y deben ser clasificados de acuerdo a su etiología. Se caracterizan por acumulación localizada de pus dentro de la pared gingival de la bolsa/surco periodontal, causa destrucción rápida del tejido que puede comprometer el pronóstico del diente. Están asociados con riesgo de diseminación sistémica. Las actualizaciones en los abscesos periodontales se recogen en la tabla 10.<sup>95.100</sup>

Lesiones endo-perio con daño radicular		Fractura o crack de la raíz
Lesiones endo-perio con daño radicular	Perforación de cámara pulpar o canal radicular	
	Reabsorción radicular externa	
Lesiones endo-perio sin daño radicular	Lesiones endo-perio en pacientes con periodontitis	Grado I – Bolsa periodontal profunda y estrecha en una superficie del diente
		Grado II – Bolsa periodontal ancha y profunda en una superficie del diente
		Grado III – Bolsas periodontales profundas en más de una superficie del diente
	Lesiones endo-perio en pacientes sin periodontitis	Grado I – Bolsa periodontal profunda y estrecha en una superficie del diente
		Grado II – Bolsa periodontal ancha y profunda en una superficie del diente
		Grado III – Bolsas periodontales profundas en más de una superficie del diente

Tabla 9. Clasificación de Lesiones Endo-Periodontales.<sup>100</sup>

Absceso periodontal en pacientes con periodontitis (en una bolsa periodontal pre-existente)	Exacerbación aguda	Periodontitis no tratada		
	Tras el tratamiento	Respuesta inadecuada al tratamiento periodontal		
		Terapia periodontal de mantenimiento		
		Tras raspado		
		Tras cirugía		
Absceso periodontal en pacientes sin periodontitis (sin obligatoriedad de bolsa periodontal pre-existente)	Impactación	Hilo dental, elástico de ortodoncia, palillo de dientes, dique de goma, restos de palomitas de maíz, etc.		
		Hábitos dañinos		
		Morderse las uñas, apretar alambres, etc.		
		Factores ortodóncicos		
	Fuerzas ortodóncicas o mordida cruzada			
	Hiperplasia gingival			
	Alteración de la superficie radicular	Alteraciones anatómicas severas	Diente invaginado u odontodisplasia	
		Alteraciones anatómicas menores	Desgarros de cemento, perlas del esmalte o surcos del desarrollo	
		iatrogenias	Perforaciones	
		Daño radicular severo	Fisura, fractura o síndrome del diente fisurado	
		Reabsorción radicular externa		

Tabla 10. Clasificación de abscesos periodontales basados en los factores etiológicos involucrados<sup>100</sup>.

## 2.3. ÍNDICES GINGIVALES Y PERIODONTALES

Las enfermedades inflamatorias de la encía y del periodonto, sus síntomas y el desencadenante de dichas afecciones, la placa microbiana, pueden determinarse clínicamente mediante índices cualitativos y/o cuantitativos. Los índices sirven principalmente para elaborar estudios epidemiológicos, pero también pueden formar parte de un estudio individual.<sup>1-</sup>

<sup>4,196</sup> La aparición de los índices surge en los años 40 por la necesidad de trabajar estadísticamente con los datos recogidos en las consultas de una forma objetiva y unificando los criterios de diagnóstico de las distintas patologías periodontales en nuestros pacientes.<sup>1,196</sup>

Los índices son expresiones numéricas de criterios diagnósticos definidos. Un buen índice debe proporcionar información cuantitativa y cualitativa sobre los criterios investigados (enfermedad, sus causas) y ser simple, objetivo, reproducible, rápido y práctico, utilizable por el personal auxiliar y susceptible de ser tratado por medios estadísticos. Existen índices muy útiles para hacer estudios epidemiológicos, sin embargo, a nivel individual en el paciente resultan poco prácticos para la motivación y el control de la patología, por lo que cuando hablamos de índices debemos diferenciarlos en dos clases:<sup>196</sup>

- Índices epidemiológicos poblacionales: tiene como finalidad realizar estudios sobre la población para determinar las causas o la evolución de la enfermedad periodontal que se vaya a estudiar. En estos índices se evalúan ciertos dientes o ciertas caras de dientes seleccionados para obtener unos datos que serán baremados para extraer conclusiones determinadas.

- Índices individuales: se basan en la realización de registros repetidos a lo largo del tratamiento de un paciente que sirven para observar la evolución de la enfermedad y eficacia del tratamiento, para motivar al paciente implicándolo en el éxito o fracaso del tratamiento realizando un mapa de todo el estado bucodental del paciente.

Existen muchos índices descritos en la literatura para el estudio de las enfermedades gingivales. Pueden clasificarse en tres grandes grupos; índices de higiene oral y cálculo, índices gingivales e índices periodontales y de tratamiento.<sup>1-</sup>

4,196

### **2.3.1. ÍNDICES DE HIGIENE ORAL Y CÁLCULO**

Los índices de higiene oral y cálculo hacen referencia a los índices de placa (valoración de placa depositada en la superficie dental), los índices de higiene (valoración de superficie libre de placa) o a los índices de depósito de cálculo supra y subgingival.<sup>196-198</sup>

- Índice de Sillness y Löe

En 1964, Sillness y Löe determinaron un índice de higiene en el cual se mide el grosor de la placa depositada sobre la superficie del borde gingival de todos los dientes presentes en la boca del paciente. Se determina pasando la punta de la sonda por la superficie dentaria y examinando la placa depositada en ella. En cada uno de los dientes se exploran cuatro unidades (vestibular, palatino/lingual, mesial y distal) y asigna distintos códigos<sup>197</sup> (Tabla 11):

Código numérico del índice de Silness y Løe (1964)	
Código	Criterio
0	No hay placa en la zona gingival.
1	Hay una película fina de placa que se adhiere al margen gingival libre y a la zona adyacente del diente. La placa sólo puede ser reconocida pasando una sonda a través de la superficie dental o revelándola. Incluye la tinción cromógena.
2	Acumulación moderada de depósitos blandos dentro de la bolsa gingival, sobre el margen gingival y/o adyacentes a la superficie dental. Se reconoce a simple vista.
3	Abundancia de material blando, grueso de 1-2 mm desde la bolsa gingival y/o sobre el margen gingival y la superficie dentaria adyacente.

Tabla 11. Índice de Løe y Silness

Los datos obtenidos se tratan dividiendo el sumatorio del valor numérico de cada unidad gingival entre el número de unidades gingivales exploradas. El número máximo de unidades gingivales serán de 128 y la puntuación máxima a alcanzar es 3.<sup>1,196-198</sup>

- Índice de Silness y Løe simplificado

Sirve para obtener una valoración rápida del estado de higiene del paciente sólo en seis dientes: primer molar superior derecho (1.6), incisivo central superior izquierdo (2.1), primer premolar superior izquierdo (2.4), primer premolar inferior derecho (4.4), incisivo central inferior derecho (4.1) y primer molar inferior izquierdo (3.6). El índice se valora igual que el anterior pero solo tomando como referencia estos dientes.<sup>196-199</sup>

- Índice de Greene y Vermillion (*índice de higiene oral - IHO*)

Este índice tiene dos variantes, la extensión coronaria de la placa (índice de residuos) y la extensión coronaria del cálculo supragingival y subgingival (índice de cálculo). Los códigos y criterios para cada una de las variantes se recogen a en las tablas 12 y 13.<sup>196,200</sup>

Código numérico del índice de residuos de Greene y Vermillion	
Código	Criterio
0	No hay placa, ni manchas.
1	Residuos blandos que cubren menos de 1/3 de la superficie del diente.
2	Residuos blandos que cubren más de 1/3 pero menos de 2/3 de la superficie del diente.
3	Residuos blandos que cubren más de las 2/3 partes del diente.

Tabla 12. Código numérico del índice de residuos de Greene y Vermillion.

Código numérico del índice de cálculo de Greene y Vermillion	
Código	Criterio
0	No hay presencia de cálculo supragingival ni subgingival.
1	Cálculo supragingival que cubre menos de 1/3 de la superficie del diente, sin presencia del cálculo subgingival
2	Cálculo supragingival que cubre más de 1/3 pero menos de 2/3 partes de la superficie del diente y/o se observan depósitos únicos o aislados de cálculo subgingival.
3	Cálculo supragingival que cubre más de los 2/3 de la superficie del diente y/o hay una banda continua de cálculo subgingival.

Tabla 13. Código numérico del índice de cálculo de Greene y Vermillion.

El IHO se obtiene del promedio del sumatorio del valor numérico de cada unidad gingival dividido por el número de unidades gingivales exploradas del valor de los dos subíndices (índice de residuos más índice de cálculo). La escala de valoración se establece de la siguiente forma: de 0.0 a 1.2: *Buena higiene oral*; de 1.3 a 3.00: *Higiene oral regular*; de 3.1 a 6.0: *Mala higiene oral*.

- Índice de Greene y Vermillion simplificado

Al igual que en el índice de Silness y Løe y para facilitar la exploración en grandes poblaciones, se diseñó un índice con tan sólo seis dientes representativos de la cavidad oral (1.6; 1.1; 2.6; 4.6; 3.1 y 3.6) y en determinadas superficies gingivales (superficie vestibular de 1.6, 1.1, 2.6 y 3.1 y lingual de 3.6 y 4.6).<sup>196,201</sup>

- Índice de O'Leary

O'Leary describió dos índices, uno para determinar la presencia de placa y otro para valorar su ausencia. El más usado es el índice de presencia de placa y no valora cantidad, sino que utiliza reveladores de placa, observando cada uno de los cuatro segmentos que representan las superficies mesial, distal, vestibular y lingual de los dientes y se señala en la ficha si hay o no placa. Únicamente se registra la presencia de placa en la unión dentogingival de los dientes; los dientes que no existen deben tacharse de la ficha. Los datos se obtienen en porcentaje a partir de las superficies con presencia de placa entre las superficies totales en boca multiplicado por 100.<sup>196,202</sup>

- Índice de Lindhe

Al igual que O'Leary, Lindhe describió un índice de placa (presencia de placa en boca) y uno de higiene (ausencia de placa en boca). Tanto este como el anterior son índices que se utilizan en la práctica individual y permiten establecer la distribución de la placa en la cavidad oral de un paciente, en lo que se llama «patrón de placa o de higiene». Los valores se establecen a partir del número total de caras libres de placa entre el número total de caras presentes en boca multiplicados por 100.<sup>196,203</sup>

- Índice de Quigley y Hein

Este índice fue modificado más tarde por Turesky. En ellos se valora el área cubierta por placa de la superficie vestibular dental teñida con fucsina básica al 0,75% y se puntúa de 0 a 5 según el grado de extensión.<sup>196,204</sup>

- Índice de placa de Turesky

En 1962, Quigley y Hein comunicaron una medición de la placa enfocada sobre el tercio gingival de superficie dentaria. Sólo examinaron las superficies vestibulares de los dientes anteriores, usando un enjuague bucal de fucsina básica como agente revelador y un sistema de puntuación numérica desde 0 hasta 5. Turesky y cols. fortalecieron la objetividad de los parámetros Quigley-Hein redefiniendo las calificaciones del área correspondiente al tercio gingival.<sup>196,205</sup>

Para llevar a cabo este índice se examinan las superficies vestibulares de los dientes anteriores, usando un enjuague bucal de fucsina básica como agente revelador de placa y se utilizará un sistema de puntuación numérica desde 0 hasta

5, estableciéndose dichos valores con las referencias recogidas en la tabla 14.<sup>205</sup>

Índice de placa de Turesky	
Código	Criterio
0	No hay placa.
1	Vetas independientes de placa en el margen cervical del diente.
2	Banda delgada continua de placa (hasta 1 mm) en el margen cervical.
3	Banda mayor a un milímetro de ancho, pero que cubre menos de una tercera parte de la corona.
4	La placa cubre un tercio, pero no más de dos terceras partes de la corona.
5	La placa cubre dos tercios o más de la corona.

Tabla 14. Índice de placa de Turesky.

- Índice de placa de la Armada modificado

Este índice fue desarrollado por Elliott y cols. en 1972. La superficie vestibular de los dientes se divide en nueve áreas y se valora mediante sí/no el número de áreas que ocupa la placa.<sup>196,206</sup>

- Índice de Martens y Meskin

La superficie vestibular de los dientes se divide en cinco áreas y se valora mediante sí/no el número de áreas que ocupa la placa.<sup>196,207</sup>

### 2.3.2. ÍNDICES GINGIVALES

- Índice gingival de Løe y Silness

El índice de Løe y Silness fue publicado en 1967. Mide la gravedad de la respuesta inflamatoria alrededor de todos los dientes presentes en la boca ya que

determina la cantidad, la calidad, la severidad y la localización de la misma. Se considera la inflamación de la encía en cuatro grados (0-4). Se mide por las zonas vestibular, lingual, mesial y distal de todos los dientes. El síntoma hemorragia sólo está presente a partir del grado 2.<sup>196,197,208</sup> Para determinarlo se aplica una sonda periodontal de punta redonda (sonda de la OMS) en el surco gingival.<sup>196,197,208</sup> Cada unidad gingival se puntúa de 0 a 3. Se valora el promedio de todos los valores obtenidos. Podemos obtener con este índice: IG de diente, IG de grupo dental, IG de sextante y/o IG de individuo. Es adecuado en diagnósticos colectivos (estudios epidemiológicos transversales y experimentales) y menos indicado para estudios individuales dado el escalonamiento demasiado burdo de las diferencias (Tabla 15).

196,197,208

Índice gingival de Løe y Silness, 1967	
Código	Grado
0	Encía normal, ninguna inflamación, ningún cambio de color, ninguna hemorragia.
1	Inflamación leve, ligero cambio de color, pequeña alteración de la superficie, ninguna hemorragia.
2	Inflamación moderada, enrojecimiento, hinchazón, hemorragia al sondear y a la presión.
3	Fuerte inflamación, enrojecimiento intenso, hinchazón, tendencia a las hemorragias, eventualmente ulceración.

Tabla 15. Índice gingival de Løe y Silness.

- Índice de Løe y Silness reducido.

Por similitud al índice de placa reducido y por ergonomía en los estudios epidemiológicos se utiliza este índice en el que se toma como medida las zonas

vestibular, lingual, mesial y distal en seis dientes seleccionados (16, 12: 24 y 36, 32; 44).<sup>196,208</sup>

- Índice de sangrado gingival.

El índice de sangrado gingival se utiliza para evaluar la respuesta del tejido gingival a la inflamación. Se empleará una sonda periodontal para el examen, la cual se introducirá en el surco gingival en cada una de las zonas gingivales del diente (vestibular, mesial, distal y lingual o palatino) asignando un valor de 0 a 3 correspondiente a los grados que se recogen a en la tabla 16.<sup>209</sup>

Índice de sangrado gingival	
Código	Grado
0	Ausencia de inflamación.
1	Inflamación leve, leve cambio en el color y hay edema gingival. No sangra al sondaje.
2	Inflamación moderada, enrojecimiento, edema e hipertrofia gingival. Sangra al Sondaje (a los 10 segundos).
3	Inflamación severa, marcado enrojecimiento e hipertrofia. Puede haber ulceraciones. Tiende al sangrado espontáneo.

Tabla 16. Índice de sangrado gingival.

- Índice de Saxer y Mühlemann (Hemorragia de las papilas)

El índice de Saxer y Mühlemann, descrito en 1975, es un indicador sensible de la inflamación gingival tanto en el diagnóstico individual como en la investigación clínica. Para determinar este índice, se emplea una sonda roma que se desliza por el surco desde la base hasta la punta de la papila tanto en su vertiente mesial como en la distal de los dientes adyacentes. Se exploran tan sólo las papilas por su

superficie vestibular en los cuadrantes superior izquierdo (2º) e inferior derecho (4º) y por su superficie lingual o palatina en los cuadrantes superior derecho (1º) e inferior izquierdo (3º). Los grados y criterios quedan recogidos en la tabla 17.<sup>198,210,211</sup>

Índice de Saxer y Mühlemann	
Código	Grado
0	No hay sangrado.
1	Aparece un único punto hemorrágico en la papila.
2	Visible una fina línea o varios puntos hemorrágicos.
3	El triángulo interdental se llena en mayor o menor cantidad, con sangre.
4	Hemorragia profusa inmediata al sondaje. Según la gravedad llega al diente o pasa a la encía. Gotas.

Tabla 17. Índice de Saxer y Mühlemann.

Después de sondar cada cuadrante, se evalúan los índices de puntuación del surco sondado comenzando en la primera papila sondada. Cuando no falta ningún diente se valorarán 28 papilas. Se exceptúa la papila de los incisivos centrales superiores e inferiores y los sectores distales de los terceros molares si es que éstos están presentes. Si falta un diente, su papila correspondiente se tacha de la ficha. Los datos se obtienen sumando el valor de los puntos sangrantes entre el número de papilas exploradas (máximo 28).<sup>196,210-211</sup>

- Índice de Lindhe

Lindhe llevó a cabo una modificación del índice original de Ainamo y Bay de 1975 en 1983. Para llevar a cabo este índice se pasa la sonda periodontal a través de la zona crevicular de cada uno de los dientes y se va anotando en sus unidades

gingivales si sangra o no (calificación dicotómica). Se debe esperar entre 15 y 30 segundos para su lectura tras sondar. Debido a que se exploran más de 100 puntos de medida, éste índice sólo se usa en exploraciones individuales.<sup>196,212,213</sup> Se calcula el porcentaje de las superficies sangrantes dividiendo el número de puntos sangrantes en boca entre el número de superficies exploradas (máximo 128) y multiplicando este valor por 100.<sup>196,212,213</sup>

- Índice de Mühlemann y Son o índice de sangrado del surco gingival

En este índice valoramos el sangrado del surco gingival bajo la acción suave de la sonda periodontal a través de la zona crevicular de cada uno de los dientes. También se valora el enrojecimiento, hinchazón y edema de la encía. Los valores se pueden anotar separadamente para la papila y/o para el margen gingival.<sup>196,214</sup>

### 2.3.3. ÍNDICES PERIODONTALES Y DE TRATAMIENTO

Son índices que se utilizan para medir la placa y el cálculo dental, las alteraciones gingivales y el posible sangrado gingival tras el sondaje; también valoran el estado periodontal y finalmente pueden utilizarse para indicar las necesidades de tratamiento de poblaciones.

- Índice CPITN (Community Periodontal Index Treatment Needed o Índice Periodontal de Necesidades de Tratamiento de la Comunidad)

Descrito por Ainamo y cols. en 1982,<sup>196,215</sup> es el índice que más se ha utilizado para las encuestas epidemiológicas,<sup>196,215</sup> después de ser aceptado por la Federación Dental Internacional (FDI) y la Organización Mundial de la Salud

(OMS),<sup>196,216</sup> aunque también se puede aplicar de forma individual.

Para la recogida de datos, la boca se divide en sextantes limitados por los caninos y se excluyen los terceros molares. Para que un sextante sea válido debe tener al menos dos dientes funcionales. Si sólo queda uno, éste se incluye en el sextante adyacente. Para los sujetos mayores de 20 años, se examinan dientes seleccionados, que son los llamados dientes índice: 1.7-1.6, 1.1, 2.6-2.7, 3.6-3.7, 3.1, 4.6-4.7.

En cada sextante se anota la peor de las puntuaciones obtenidas tomadas de los dientes seleccionados, y si éstos no están presentes, se examinan todos los demás dientes del sextante, anotando la puntuación del diente más afectado. En los sujetos menores de 20 años, se examinan seis dientes, que son: 1.6, 1.1, 2.6, 3.1, 3.6 y 4.6. Para efectuar el examen se realizan seis puntos de sondaje en cada diente (punto mesio-vestibular, medio- vestibular, disto- vestibular y los puntos correspondientes en lingual). Para ello se utiliza una sonda específicamente diseñada con una bolita de 0,5 mm de diámetro en su extremo y marcada en negro la zona comprendida entre los 3,5 mm y los 5,5 mm. Existe una variante de dicha sonda, que además incluye marcas a los 8,5 y 11,5 mm. La sonda debe usarse con poca presión (20-25 g) para no lesionar la encía y debe seguir la configuración anatómica de la superficie del diente.

En los niños menores de 15 años sólo se medirá el sangrado gingival y el cálculo, debido a la posible presencia de pseudobolsas de erupción de los segundos molares. Los valores de este índice se recogen en la tabla 18.<sup>196,215</sup>

En función de los datos obtenidos anteriormente se establece la necesidad de tratamiento para cada sextante (NT), los cuales se recogen en la tabla

19.<sup>196,215,216</sup>

- **ÍNDICE CPI** (Community Periodontal Index o Índice Periodontal Comunitario)

Descrito en 1997, el índice CPI es una variante del CPITN porque también mide la presencia de sangrado periodontal, el cálculo y las bolsas periodontales, pero lo completa ya que recoge la pérdida de inserción o fijación de los dientes. Al igual que en el índice CPITN, la boca se divide en sextantes y se examinan los mismos dientes, pero en este caso, un sextante debe ser examinado si contiene dos o más dientes no indicados para la extracción y en caso contrario se considera como sextante excluido. Además, si queda solo un diente en un sextante, no se incluye en el sextante adyacente. La sonda utilizada es la misma que hemos descrito anteriormente, pero tiene dos anillos más: uno a los 8,5 mm y el otro a los 11,5 mm. Los códigos y utilizados son los mismos que en las tablas 18 y 19.<sup>196,217</sup>

Índice CPITN	
Código	Criterio
0	Ausencia de signos patológicos.
1	Existe sangrado al sondar. No hay cálculo. No tiene bolsa (sondaje menor de 3,5 mm).
2	Existe sangrado al sondar. No hay cálculo. No tiene bolsa (sondaje menor de 3,5 mm).
3	Bolsa periodontal menor de 3,5 mm (banda negra parcialmente oculta).
4	Bolsa periodontal de 5,5 mm o más (banda negra completamente oculta).

Tabla 18. Índice CPITN.

La pérdida de soporte nos da información sobre la pérdida de inserción del diente. Es útil para establecer comparaciones entre grupos de población, pero no sirve para describir la pérdida de fijación total en un individuo. La medición de la pérdida de inserción es un parámetro exacto del estado del diente; sin embargo, conocer exactamente la distancia entre la línea amelocementaria y el fondo de la bolsa es difícil en las situaciones en que no existe recesión gingival que exponga la línea amelocementaria. Para solucionar esto, cuando es la línea amelocementaria es invisible, ya sea por sobrecrecimiento gingival o porque coinciden la unión dentogingival, recurrimos a los resultados obtenidos en el CPI y así, si el grado máximo de CPI para un sextante es inferior a un código 4 (profundidad de sondaje igual o menor de 6 mm), la pérdida de fijación para ese sextante se calcula que es menor de 4 mm, que corresponde a un grado de fijación = código 0. Los valores se recogen en la tabla 20.<sup>194,216,217</sup>

Código y criterios del índice de necesidad de tratamiento (NT) a partir del CPITN	
Código	Criterio
<b>NT0</b>	No necesita tratamiento (código 0).
<b>NT1</b>	Necesita instrucción en higiene oral (IHO) (código 1).
<b>NT2</b>	Eliminación de cálculo y/o obturaciones desbordantes (códigos 2 y 3): Enseñanza de higiene oral + tartrectomía + raspado y alisado radicular.
<b>NT3</b>	Necesita tratamiento complejo (código 4): Enseñanza de higiene oral + tartrectomía + raspado y alisado + cirugía periodontal.

Tabla 19. Código y criterios del índice de necesidad de tratamiento (NT) a partir del CPITN.

- Sistema PSR (Periodontal Screening and Recording)

El sistema de Periodontal Screening and Recording (PSR) se desarrolló en

1992 por la Academia de Periodoncia Americana (A.A.P.) y la Asociación Dental Americana (A.D.A.). El objetivo de este sistema era facilitar la detección temprana de la enfermedad periodontal con una técnica de sondaje simple. El PSR es la aplicación a la exploración dental básica del índice CPITN añadiendo el código (\*) cuando aparecen anomalías periodontales adicionales como presencia de furcas, movilidad dental, defectos mucogingivales o recesiones.<sup>196,216-219</sup>.

Códigos y criterios del índice CPI (pérdida de fijación)	
Código	Criterio
0	Pérdida de fijación entre 0-3 mm (LAC no visible y códigos de CPI de 0 a 3).
<b>Si el grado de CPI es 4 o si la LAC es visible:</b>	
1	Pérdida de fijación de 4-5 mm (LAC dentro de la banda negra)
2	Pérdida de fijación de 6-8 mm (LAC entre el límite superior de la banda negra y el anillo de 8,5 mm).
3	Pérdida de fijación de 9-11 mm (LAC en los anillos de 8,5 mm y 11,5 mm).
4	Pérdida de fijación de 12 o más (LAC más allá del anillo de 11,5 mm).
X	Sextante excluido (menos de dos dientes presentes).
9	Sextante no registrable (no visible o no identificable).

Tabla 20. Códigos y criterios del índice CPI (pérdida de fijación).

- Examen Periodontal General Reducido (EPGR)

El examen periodontal general reducido fue presentado por Galván y cols. en 2002. En este sistema se combina la profundidad de sondaje y el índice de sangrado gingival. Su aplicación es fundamentalmente individual, aunque puede ser usado epidemiológicamente.<sup>194,220</sup>

- Índice periodontal de Ramfjord.

Este índice fue descrito por Ramfjord en 1959, también se conoce como “índice de enfermedad periodontal”, siendo la combinación de un código de puntuación para la inflamación de la encía en función del color, forma, densidad y tendencia a la hemorragia de los tejidos gingivales y la medición de la profundidad de bolsa en relación al límite amelocementario (LAC). Los dientes que se examinan para la obtención de los parámetros son 1.6; 2.1; 2.4; 3.6; 4.1 y 4.4.<sup>199</sup>

El estudio de estos dientes en otros parámetros se recoge como “dientes de Ramfjord”. El código de puntuación para la inflamación gingival se recoge en las tablas 21 y 22.

Puntuación gingival para el índice periodontal de Ramfjord.	
Código	Criterio
0	Ausencia de signos de inflamación.
1	Cambios gingivales inflamatorios entre leves y moderados que no se extienden alrededor de la totalidad del diente.
2	Gingivitis entre leve y moderada y que se extiende alrededor de todo el diente.
3	Gingivitis severa caracterizada por enrojecimiento marcado tendencia a la hemorragia espontánea y ulceración.

Tabla 21. Puntuación gingival para el índice periodontal de Ramfjord.

Puntuación periodontal para el índice periodontal de Ramfjord.	
Ubicación del surco gingival	Criterio
Sobre el esmalte o en el LAC	0 a 3
≤3mm hacia apical del LAC	4
>3mm hasta 6mm hacia apical del LAC	5
>6mm hacia apical del LAC	6

Tabla 22. Puntuación periodontal para el índice periodontal de Ramfjord. (LAC: Límite amelocementario)

## 2.4. BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA DE LOS TEJIDOS GINGIVALES.

Los cambios patológicos en las enfermedades del tejido periodontal se relacionan con la presencia de microorganismos bucales, principalmente bacterias gram-negativas, como *Porphyromonas gingivalis* y *Bacteroides forsythus*, insertados en el diente, surco gingival o bolsa periodontal.<sup>1-4,221</sup>

Estos microorganismos pueden sintetizar productos como colagenasas, hialuronidasa, proteasa, sulfatasa de condroitina o endotoxinas, que provocan daño en las células epiteliales y del tejido conjuntivo, así como, en el colágeno, sustancia fundamental y el glicocálix de las células del huésped.

Como resultado de la presencia de estos microorganismos el hospedador, intentando eliminarlas, desarrolla una respuesta inflamatoria e inmune que es la causa de la destrucción de los tejidos.<sup>1-4,222-223</sup> Los productos microbianos activan a monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos, neutrófilos, células endoteliales o fibroblastos para que produzcan sustancias vasoactivas como prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), interferón (IFN), factor de necrosis tumoral (TNF) e interleucinas, entre ellas la interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) o interleucina-8 (IL-8).<sup>1-4,224-227</sup> Las citoquinas son polipéptidos reguladores que intervienen en la comunicación intercelular con un amplio espectro de propiedades inflamatorias, hematopoyéticas, metabólicas e inmunomoduladoras. Estas pueden afectar a las actividades de los leucocitos, osteoblastos y osteoclastos y promover el proceso de remodelación de tejidos tanto de forma sistémica como localmente.<sup>1-4,223-227</sup>

La activación de la señalización intracelular puede iniciarse exclusivamente como una respuesta inmune innata asociada con la detección de patrones

moleculares relacionados con la microbiota (MAMP) mediada por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Sin embargo, los mediadores biológicos expresados como un resultado de la señalización de PRR incluyen moléculas coestimuladoras que participan en la inducción de la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata y la inflamación no son lo mismo, sin embargo, la inflamación se presenta sobre todo en respuesta a la infección o a los microorganismos de la biopelícula dental. La reacción inflamatoria local en respuesta a las bacterias de la biopelícula dental, se caracteriza por un aumento inicial del flujo sanguíneo, aumento de la permeabilidad vascular y la entrada de células de la sangre periférica en el surco gingival. Estos eventos iniciales son provocados por moléculas bioactivas como la histamina, la bradiquinina, PGE<sub>2</sub> y el óxido nítrico y son producidas por células inmunes innatas y células inmunes residentes en los tejidos periodontales. Los polimorfonucleares (PMN) o neutrófilos atraídos por otras moléculas bioactivas (como la IL-8) migran atravesando el revestimiento epitelial del surco gingival para ser la primera línea de defensa contra la invasión de bacterias de la placa y de sus productos derivados. Estas células son fagocitos no específicos responsables de una defensa aguda y rápida. Tras esto, hay un aumento en el número de monocitos y macrófagos, así como la entrada de linfocitos T y B en el área afectada (Figura 1).<sup>1-4,224-225</sup>

Una vez activadas las citocinas, moléculas bioactivas y MAMP presentes en el área, las células en infiltración producen otros mediadores inflamatorios que modulan la actividad de otras células y afectan a la homeostasis de tejidos no mineralizados y mineralizados en el periodonto (Figura 2). Las citocinas responsables de las respuestas tempranas a la agresión microbiana incluyen IL-1 $\alpha$ ,

IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ . Otros mediadores inflamatorios incluyen el factor inhibidor de la leucemia (LIF), interferón- $\gamma$ , oncostatina M, factor neutrófilo ciliar, TGF- $\beta$ , IL-11, IL-12, IL-17, IL-18 y IL-8. El efecto neto de una respuesta inflamatoria está determinado por el equilibrio entre citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias como la IL-4, IL-10, IL-13, IL-16, IFN- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1Ra y receptores solubles para TNF o IL-6.<sup>1-4,221-227</sup>

Los pacientes con inflamación gingival tienen altas concentraciones de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , RANKL y matriz metalopeptidasa 13 (MMP13) en el líquido crevicular. Los niveles elevados de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-17, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en tejidos gingivales también se asocian con enfermedad periodontal destructiva.

En tejidos clínicamente sanos, se ha observado también la presencia de citoquinas proinflamatorias, pero en baja cantidad, ya que la concentración de citoquinas debe ser adecuada para mantener la homeostasis de los tejidos. La liberación de citoquinas puede ser desencadenada de forma directa mediante contacto antigénico o indirecta mediante moléculas de señalización expresadas por células inmunes antígeno-reactivas.<sup>1-4,221-227</sup>

El fluido crevicular es un exudado normal del plasma que fluye por el surco gingival, contiene citocinas como la IL-6 e IL-8, y componentes inflamatorios que se asocian con la periodontitis, y aumenta durante el proceso inflamatorio.<sup>1-4,228-232</sup> Estos mediadores a su vez sirven como prueba diagnóstica.

La IL-6 es una citocina multifuncional que tiene un gran número de actividades biológicas incluyendo la diferenciación de linfocitos B, la proliferación de linfocitos T y la estimulación de la inmunoglobulina por la secreción de los linfocitos B.<sup>1,231-234</sup> La IL-6 induce la reabsorción ósea por sí misma y en

combinación con otros agentes de reabsorción ósea, como puede ser la IL-1 $\beta$ <sup>232</sup>.

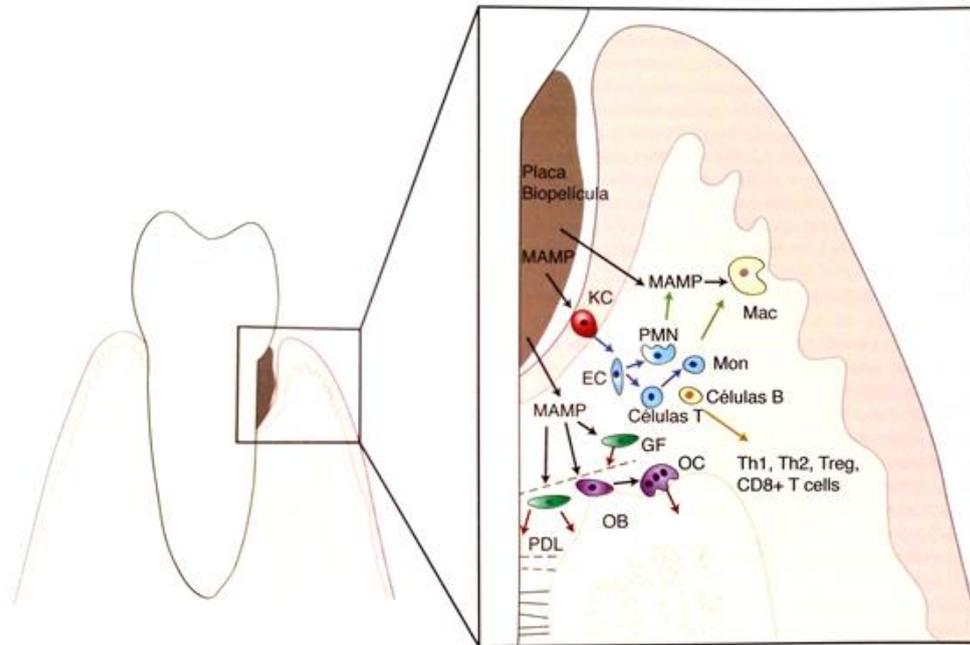


Figura 1. Patrón molecular relacionado con la microbiota (MAMP) de microorganismos en la biopelícula dental activa las respuestas inflamatorias de los tejidos periodontales. Los mediadores biológicos pueden afectar a las células vecinas (*flechas azules*) mediante la inducción de la expresión de otros mediadores (Ej. RANKL) o por quimiotaxis desencadenantes (*flechas verdes*). El daño directo a los tejidos periodontales también puede resultar tras la estimulación de MAMP (*flechas rojas*) como la secreción de metaloproteinasas por fibroblastos gingivales y el ligamento periodontal. (MAMP, patrones moleculares relacionados con la microbiota; RANKL, ligando receptor activador del factor nuclear (NF) kappa B; KC, queratinocitos; Mac, macrófagos; GF, fibroblastos gingivales; PDL, fibroblastos del ligamento periodontal; OB, osteoblastos; OC, osteoclastos; EC, célula endotelial; PMN, neutrófilos polimorfonucleares; Mon, monocito; *células T*, linfocitos T, *Células B*, linfocitos B<sup>1</sup>).

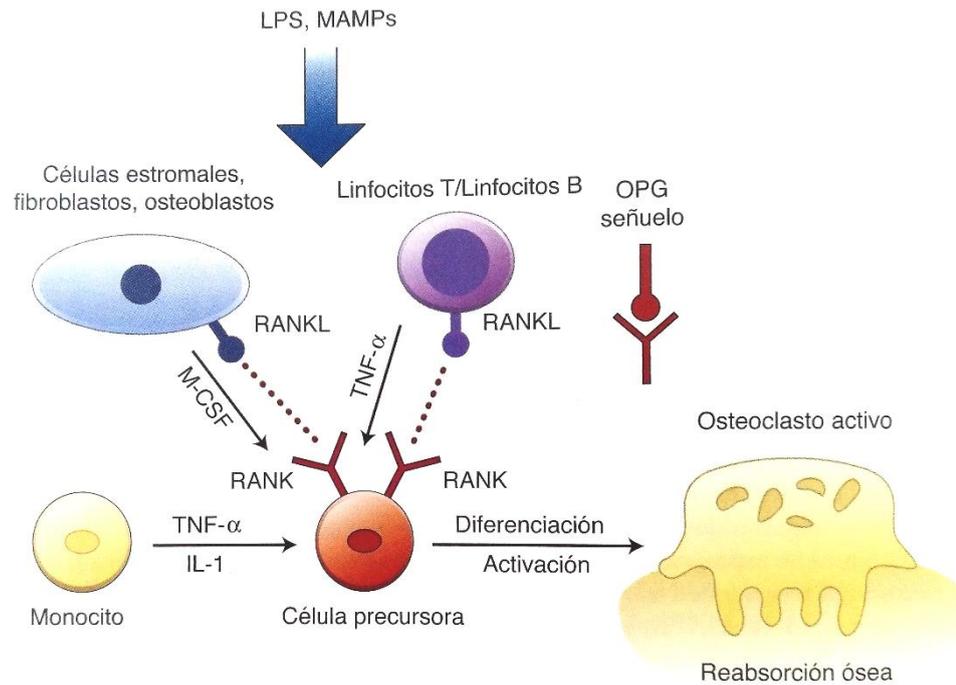


Figura 2. Estímulos de los factores que regulan la osteoclastogénesis. Citocinas (IL-1, TNF- $\alpha$ , factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), producido por células residentes óseas (células estromales, fibroblastos, osteoblastos) y células inmunes (monocitos, Linfocitos T y B) son reguladores fundamentales de este proceso. La osteoprotegerina (OPG) actúa como un receptor señuelo que impide que el ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B (RANKL) se una a su receptor activador de NF- $\kappa$ B en células precursoras y regule negativamente la osteoclastogénesis. El lipopolisacárido bacteriano (LSP) y otros patrones moleculares relacionados con la microbiota (MAMP) puede iniciar de manera directa o indirecta la expresión de RANKL y la osteoclastogénesis<sup>1</sup>.

La IL-8 es importante en la iniciación y en el desarrollo de los procesos inflamatorios por su capacidad de atraer y activar los neutrófilos.<sup>233</sup> Los efectos quimiotácticos y la activación mediada por IL-8 sobre los neutrófilos en la encía inflamada pueden contribuir a la destrucción del tejido periodontal. La IL-6 es útil en periodoncia como herramienta diagnóstica para identificar, anticipar el riesgo de padecerla y determinar su progresión. Para que ello sea clínicamente útil se

deben registrar cambios importantes tales como, que un sitio específico se torne activo o, que un sitio previamente afectado por la enfermedad mejore su condición como producto de la terapia periodontal. Se ha medido su concentración en el fluido crevicular, en sangre periférica y en tejido gingival para determinar la progresión de la enfermedad periodontal,<sup>234-238</sup> y se ha encontrado que la IL-6 es indicador de pérdida de inserción incipiente y de actividad de la periodontitis.

Sin embargo, los niveles de IL-8 encontrados en pacientes periodontales en el fluido crevicular no siempre se correlacionan con la enfermedad periodontal. Hay estudios que demuestran la presencia de IL-8 aumentada en pacientes con periodontitis, pero igualmente se muestra su presencia en individuos sanos y concentraciones bajas en bolsas profundas.<sup>238-240</sup>

A pesar de la abundancia de publicaciones que investigan los perfiles de citocinas asociadas a la enfermedad periodontal, la descripción definitiva no se ha encontrado debido entre otras razones a la difícil identificación de focos de progresión activos, es decir, aquéllos en los que está aconteciendo una pérdida de inserción y reabsorción del hueso alveolar. Lo que sí sabemos es que una vez que comienzan los procesos inmunes e inflamatorios y se establece la compleja red de citocinas, diversas moléculas inflamatorias que juegan un papel directo en la degradación del tejido no mineralizados y mineralizados del periodonto son producidas en respuesta a los MAMP.<sup>1,221-227</sup> Una familia dentro de estas moléculas inflamatorias es la familia de las matrixmetalopeptidasas. Ésta es una familia de proteasas neutras que dependen del zinc y el calcio y tienen un papel esencial en la renovación y degradación de la matriz extracelular. Su actividad está regulada

en múltiples niveles (transcripcional, postranscripcional y postraducciona). De esta manera, las MMP pueden degradar todos los componentes de la matriz extracelular y los niveles altos se han asociado con la enfermedad periodontal en humanos.<sup>1,221-227</sup>

## **2.5. COLOR. PROPIEDADES Y SISTEMAS DE MEDICIÓN.**

El color es una percepción del ojo humano resultante de la estimulación visual por parte de determinadas longitudes de onda. Las ondas visibles están comprendidas entre las longitudes de onda entre los 400 y los 700 nanómetros, siendo el resto de radiaciones imperceptibles por la vista humana.<sup>241</sup>

Los diferentes colores del espectro visible se encuentran ordenados en el círculo cromático, que incluye tres colores primarios: amarillo, cian y magenta (colores puros imposibles de obtener con ninguna mezcla); tres colores secundarios: verde, rojo y azul intenso (obtenidos de la mezcla de dos colores primarios); y seis colores terciarios: naranja, carmín, violeta, azul ultramar, verde esmeralda y verde claro (obtenidos tras mezclar un color primario con un color secundario adyacente en el círculo cromático).<sup>241-247</sup> El círculo cromático nos permite seleccionar los colores adecuados y las relaciones cromáticas entre ellos. También es útil para la explorar las temperaturas del color.<sup>241-247</sup>

Sin embargo, nuestra percepción de los diferentes colores de la gama cromática se ve alterada por varios factores que hacen único a cada color y condicionan sus características finales. Entre las propiedades del color encontramos propiedades primarias y secundarias.<sup>241-247</sup>.

### **2.5.1. Propiedades del color**

**a) Propiedades primarias**

- Matiz o tonalidad: Es el estado puro del color, aquél que encontramos dentro de la gama cromática, así como la sumatoria de las diferentes longitudes de onda que pueden reflejarse en una superficie. Son colores saturados en los que no se encuentran agregados ni el blanco ni el negro.<sup>241-247</sup>
- Valor o luminosidad: Hace referencia a la cantidad de luz percibida, siendo un valor utilizado para determinar cuan claro u oscuro es un color. La luminosidad varía con la adición a los colores del espectro visible de los colores blanco o negro. Cuanto más blanco contenga un color se obtendrán valores de mayor luminosidad, mientras que la adición de negro la disminuirá intensificando la oscuridad.<sup>241-247</sup>
- Croma o saturación: Determina la viveza o palidez de un color, su intensidad o pigmentación. Los colores que mayor saturación poseen son los colores puros del espectro, siendo los primarios los de mayor intensidad, mientras que los grises representan los de menor nivel de saturación. La saturación puede apreciarse como la brillantez de un color, ya que cuanto más gris posea, menos brillante o menos saturado se percibirá y por lo tanto menos vivo.<sup>241-247</sup>

**b) Propiedades secundarias**

Las propiedades secundarias hacen referencia a los efectos ópticos que presentan los colores frente a la luz.<sup>241-247</sup>

- Translucidez: Puede considerarse como una cuarta dimensión del color, ya que juega un papel muy importante en la transmisión de la luz

describiéndose como un estado intermedio entre la opacidad y la transparencia. Supone el grado en que la luz visible es transmitida a través de un cuerpo.<sup>241-247</sup>

- **Morfología de superficie:** Las características de la superficie en la que incide la luz pueden provocar cambios en la percepción del color y la translucidez. Cuando la luz incide sobre una superficie lisa, los rayos reflejados son paralelos y la superficie puede parecer más translúcida, mientras que, en superficies rugosas, los rayos de luz se dispersan y la superficie puede parecer más opaca. En el caso de la encía, la morfología de superficie tiene gran repercusión debido a la variabilidad de texturas, desde superficies rugosas con punteado “en piel de naranja” hasta superficies lisas y brillantes.<sup>241-247</sup>
- **Fluorescencia:** Es la propiedad de algunas estructuras de reflejar luz con diferente longitud de onda de la que tiene la luz la recibida.<sup>241-247</sup>
- **Opalescencia:** El término deriva del comportamiento que tiene ciertos minerales llamados ópalos cuando reciben luz. Esta luz es absorbida con diferentes proporciones tras la reflexión dando un aspecto lechoso.<sup>241-247</sup>
- **Iridiscencia:** Es el fenómeno óptico que se caracteriza por la variabilidad del tono de luz de acuerdo con el ángulo desde el que se observa una superficie concreta causada por múltiples reflexiones de luz.<sup>241-247</sup>

### 2.5.2. Medición del color de la encía

Cuando se trata de determinar el color de la encía, esta medición puede verse influenciada por diferentes factores como el color del ambiente, la capacidad

del observador y la luz ambiental. Por esta razón, se han determinado diferentes sistemas de medición del color para tratar de obtener los resultados más objetivos posibles.<sup>246-248</sup>

### 2.5.3. Sistemas de medición del color de la encía

- Sistemas subjetivos:
  - Guías de color: Consisten en la comparación del color con un patrón estándar o guía de color. Son los sistemas más comúnmente empleados en Odontología, sin embargo, no son reproducibles y están influenciados por la fuente de iluminación y por el observador.<sup>249-252</sup>
- Sistemas objetivos: En este caso se trata de instrumentos de medición que tratan de representar los colores del espectro visible de una forma numérica para obtener valores uniformes, reproducibles y precisos sin importar las condiciones ambientales de luz y color y sin verse influenciado por los errores de percepción del ojo humano.<sup>253-254</sup> Entre estos métodos encontramos:
  - Fotografía digital: Aun siendo una referencia inicial muy útil, no puede considerarse como un instrumento de medición del color adecuada, ya que presenta variaciones de calibración e iluminación y problemas de interpretación del color.
  - Colorímetro: Es un instrumento que identifica el tono y el matiz del color. Mide la absorción de la luz por los objetos. Incorporan una fuente de luz propia y disponen de la capacidad de tomar el color de

diferentes zonas. Sin embargo, el colorímetro requiere de filtros de color para separar la luz que les llega en sus componentes rojo, verde y azul, pudiendo provocar errores debidos a su degradación, por lo que han de estar revisándose continuamente.<sup>255</sup>

- Espectrofotómetros: Estos instrumentos sirven para medir, en función de la longitud de onda, la relación entre valores de una misma magnitud fotométrica relativos a dos haces de radiaciones. Estos dividen el espectro de luz visible en franjas separadas y distintas, y mide el número de fotones que cae en cada una de ellas. La espectrofotometría es el método de análisis óptico más usado en las investigaciones biológicas debido a su alta precisión, ya que pueden tener en cuenta la translucidez del objeto logrando una medición muy exacta del color.<sup>256-257</sup> Por esta razón, éste ha sido el instrumento que ha sido elegido para la realización de la medición del color del tejido gingival dentro de nuestro estudio clínico.

## 2.6. PROANTOCIANIDINAS OLIGOMÉRICAS

El presente estudio intenta valorar el uso de un complemento nutricional a base de arándano, fruto rojo rico en proantocianidinas oligoméricas (OPCs; acrónimo de *oligomeric proanthocyanidins*) asociado a vitamina C (suplemento aprobado por la EFSA /CEE Art.13.) como compuesto preventivo de la gingivitis.<sup>258-265</sup>

### 2.6.1. Descripción y estructura química.

Las proantocianidinas oligoméricas (OPCs,) son unas de las sustancias polifenólicas más abundantes que hay en el reino vegetal. Hoy día están en continua investigación debido a que aparte de su potente actividad antioxidante, se ha demostrado que tienen propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, antimicrobianas y vasodilatadoras, revelándose como una herramienta terapéutica potencialmente valiosa para el tratamiento de gran variedad de afecciones.<sup>262-268</sup>

Los polifenoles son un conjunto de moléculas con propiedades antioxidantes. Existen quince tipos diferentes, entre ellos los flavonoides, los cuales constan de dos anillos aromáticos unidos por tres átomos de carbono, formando un anillo heterocíclico. Dentro de la familia de los flavonoides, existe un subtipo conocido como flavan-3-ol, semejantes a los flavonoides en su estructura, pero no tienen el grupo cetona en el carbono C4. El flavan-3-ol se polimeriza dando lugar a las proantocianidinas con diferentes pesos moleculares. La combinación de estos monómeros da lugar a dos tipos de oligómeros; si los monómeros se unen entre sí por enlaces simples en el anillo B dan lugar a proantocianidinas de tipo B; y si están unidos por enlaces dobles se denominan proantocianidinas de tipo A (Figura 3).<sup>269,273</sup>

Las proantocianidinas oligoméricas responsables de las biológicas atribuidas al arándano rojo son las proantocianidinas de tipo A. Éstas son oligómeros de alto peso molecular o polímeros a base de una unidad básica flavan-3-ol como hemos dicho anteriormente que tienen un grado medio de polimerización de entre cuatro y once. El peso molecular de las proantocianidinas puede llegar a ser hasta de 50

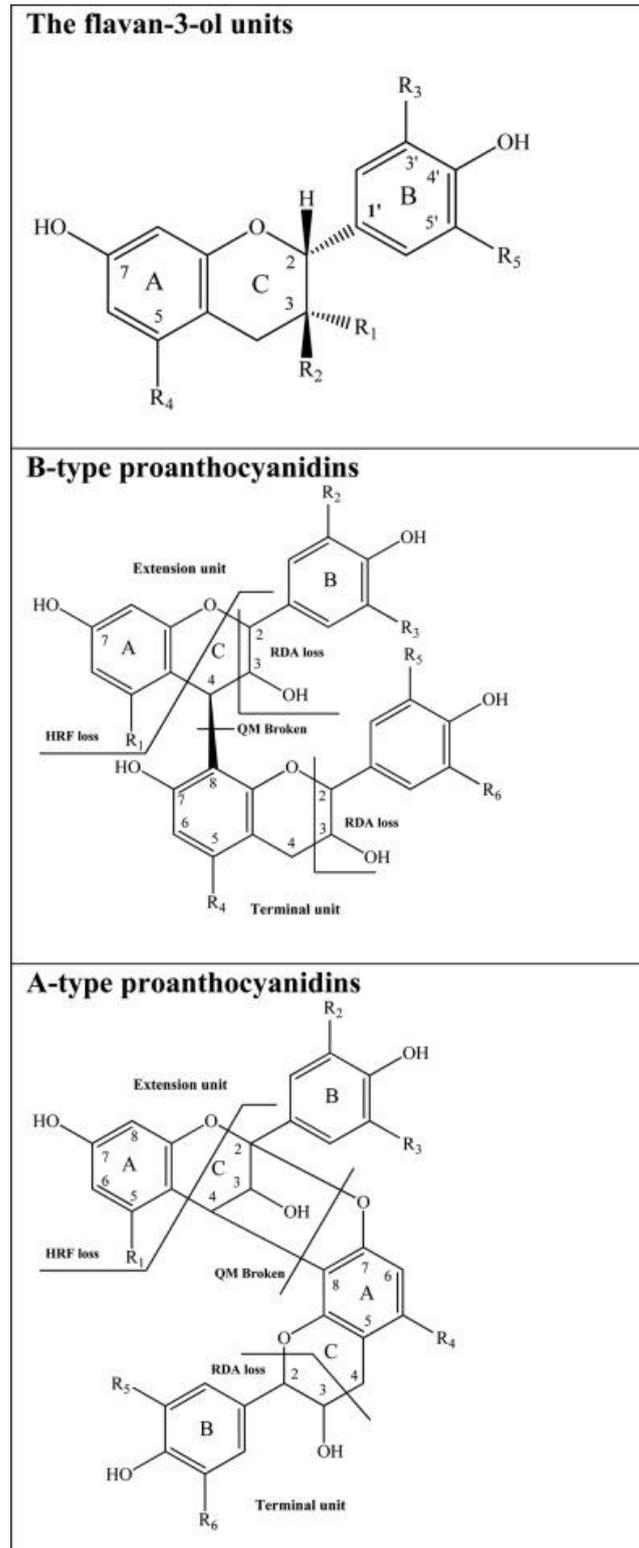


Figura 3. Estructura química de unidad flavan-3-ol; proantocinidinas tipo B y proantocianidinas tipo A.<sup>269</sup>

La clasificación de los compuestos fenólicos puede realizarse en función de la estructura molecular, según el número de anillos aromáticos y de los grupos hidroxilos enlazados, dando lugar a compuestos flavonoides (en el que se encuentran las OPCs) y no flavonoides.<sup>274-277</sup> La solubilidad es otro factor para la clasificación de los compuestos, siendo los solubles en agua los ácidos fenólicos, los fenilpropanoides, los flavonoides (OPCs) y quinonas.<sup>278</sup> Los estudios realizados en seres humanos en relación a la absorción de polifenoles son limitados y los resultados varían dependiendo de la estructura y la solubilidad de los compuestos fenólicos.<sup>273</sup>

### 2.6.2. Mecanismo de acción

La capacidad de las OPCs de unirse a las proteínas se denomina astringencia y es el motivo de que produzcan una sensación ligeramente rasposa cuando el té o el vino tinto entran en contacto con la saliva y el tejido bucal.<sup>267-268,272,279-281</sup>

La investigación disponible ha demostrado que el medio ácido del estómago humano no degrada fácilmente las proantocianidinas, por lo tanto, las tasas de absorción en el tracto gastrointestinal superior no son elevadas, ya que es necesaria la degradación de este polímero a estructuras más simples para llevar a cabo su absorción. Este hecho hace que gran parte de las proantocianidinas ingeridas alcancen el intestino delgado intactas. Sin embargo, parece que incluso los niveles bajos observados en la orina tras una dosis oral (generalmente menor del 25% de la dosis original) son suficientes para aumentar significativamente la

capacidad antioxidante en el plasma. Cuando las OPCs alcanzan el colon sufren una degradación extensa debido a la flora colónica. Los metabolitos y las propiedades biológicas de este proceso aún no han sido investigadas, pero se ha sugerido que pueden tener efectos protectores y antioxidantes directos sobre el tejido del colon.<sup>267-268,272,279-284</sup>.

### **2.6.3. Propiedades y usos terapéuticos**

Entre los polifenoles, la naturaleza polimérica de las proantocianidinas es única puesto que se unen, precipitan proteínas e inhiben las enzimas que intervienen en la degradación de los tejidos, provocando de esta manera la prevención o incluso el tratamiento de algunas afecciones sistémicas.

Las OPCs poseen propiedades antioxidantes, antimutagénicas, anticancerígenas, antiinflamatorias, antivirales, antiprotozoicas y antibacterianas. Debido a todas estas propiedades, pensamos que puede tener una clara indicación en la prevención de la gingivitis.<sup>265-284</sup>

#### **a) Acción antimicrobiana**

- **Acción antibacteriana y antifúngica**

La actividad inhibitoria de las OPCs sobre las bacterias y los hongos ha sido reconocida desde hace mucho tiempo.<sup>272,285</sup> Esto se debe a varias razones; en primer lugar, la inhibición de las enzimas microbianas extracelulares causada por el carácter astringente de las OPCs; en segundo lugar, las proantocianidinas oligoméricas tienen acción directa sobre el metabolismo microbiano (esto se debe

a la acción del ácido tánico a través de la inhibición de la fosforilación oxidativa) y por último, las OPCs son capaces de formar complejos con iones metálicos, necesarios para el crecimiento bacteriano.<sup>272,285</sup>

Estudios llevados a cabo sobre esta acción de las OPCs, mostraron como todas las proantocianidinas tiene acción antibacteriana, no obstante, las proantocianidinas tipo B tiene una capacidad antifúngica ligeramente mayor.<sup>272,286,287</sup>

Con respecto a la actividad antimicrobiana, las proantocianidinas que han resultado tener mayor respuesta son aquellas derivadas de los frutos rojos, ya que numerosos estudios defienden su uso en la prevención de las infecciones urinarias. El mecanismo de este hecho viene dado de la capacidad de las OPCs para inhibir la adherencia de la E. coli a las células uroepiteliales a través de distintos enlaces.<sup>272,288-290</sup>

- **Acción antivírica**

Existen varias publicaciones sobre la actividad antiviral de las OPCs y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus del herpes simplex (VHS). Hace algunos años, se publicaron algunos trabajos in vitro que concluían que existía una proantocianidina oligomérica de 2100 dalton de peso molecular (SP-303) capaz de inhibir la penetración del virus en la célula.<sup>272,291-296</sup> Sin embargo, hasta el momento, los estudios llevados a cabo en humanos no han tenido tan buenos resultados, por lo que se continúa con la investigación en este sentido.

- **Acción antiprotozoaria**

Existen estudios in vitro que muestran actividad antiprotozoaria por parte de las OPCs inhibiendo la supervivencia intracelular de *Leishmania donovani*, sin embargo, las proantocianidinas no fueron activas de forma extracelular.<sup>272</sup>

- b) Acción antioxidante**

El estrés oxidativo es un desequilibrio entre la generación y eliminación de especies reactivas, teniendo como característica común tener un electrón incompleto en su último orbital. Este desequilibrio conlleva que la célula es abrumada por radicales libres con gran capacidad oxidante. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (NOS) son las más habituales. Los ROS y NOS causan daño celular grave, lo que puede dar lugar a una amplia lista de enfermedades sistémicas.<sup>272,297-300</sup>

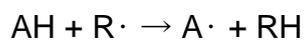
Se han descrito diferentes mecanismos antioxidantes:

1. Eliminación de radicales libres
2. Quelación de metales de transición
3. Inhibición de enzimas
4. Actividad enzimática
5. Extinción de singletes de oxígeno (Oxígeno en estado excitado).

Las proantocinidinas oligoméricas, así como otros compuestos flavonoides, tienen la capacidad de eliminar radicales libres, conseguir la quelación de metales de transición e inhibir enzimas prooxidantes.<sup>272,301</sup>

- **Eliminación de radicales libres**

El concepto básico de actividad de eliminación de radicales libres de un antioxidante (AH) es una transición redox que implica la donación de un solo electrón (o átomo de hidrógeno, equivalente a la donación de un electrón y un protón) a una especie de radicales libres ( $R \cdot$ ).<sup>272,302</sup> Durante el curso de esta transferencia de electrones, el carácter radical se transfiere al antioxidante, produciendo el radical derivado de antioxidantes ( $A \cdot$ ):



Para actuar como un antioxidante, un eliminador de radicales libres debería producir un compuesto más estable y, por lo tanto, menos dañino después de la reacción con un radical libre.

La actividad de eliminación de radicales libres de un compuesto generalmente se determina con un radical libre relativamente estable. En varios estudios, se encontró que la introducción de una función de ácido gálico en la posición 3 aumenta significativamente la actividad de eliminación de radicales, mientras que la glucosilación de la posición 3 disminuye la capacidad de eliminación.<sup>272,303-305</sup> Estos efectos se demostraron para los flavan-3-oles, así como para las procianidinas.

- **Quelación de metales de transición**

Los metales de transición, hierro y cobre, son cofactores esenciales de varias enzimas que participan en el metabolismo del oxígeno y generalmente están unidas a proteínas, como la lactoferrina y la ferritina para el hierro y la

ceruloplasmina para el cobre.<sup>272,306</sup> Sin embargo, cuando estos metales de transición están presentes en estado libre en sistemas biológicos, pueden catalizar reacciones de radicales libres.

Existen estudios que sugieren la capacidad quelante de metales de las OPCs, siendo en el caso del hierro en proporción 2:1 y en el caso del cobre 4:1.

Otras investigaciones con alimentos que contienen polifenoles, como el té y el vino tinto, han demostrado como estos compuestos son capaces de inhibir la absorción del hierro no hemo.<sup>272,307,308</sup>

- **Inhibición enzimática**

Las proantocianidinas también pueden exhibir actividad antioxidante a través de la inhibición de enzimas prooxidativas. Existen estudios que muestran la capacidad de inhibición de la lipoxigenasa,<sup>272,309,310</sup> la cual es una enzima que cataliza la peroxidación lipídica de las biomembranas y las lipoproteínas plasmáticas. Otros artículos abordan el efecto de las OPCs sobre la enzima *Óxido nítrico sintasa (NOS)*. El óxido nítrico (NO) derivado de forma endógena se sintetiza a partir de L-arginina mediante la NOS. Las procianidinas diméricas que tienen epicatequina como unidad terminal de flavan-3-ol son inhibidores de la actividad de la NOS.<sup>272,311</sup>

La autooxidación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) de los ácidos grasos poliinsaturados, también llamada peroxidación lipídica es un mecanismo común en condiciones patológicas con estrés oxidativo. La peroxidación lipídica está involucrada en la modificación oxidativa de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y que esto finalmente conduce a la formación de lesiones ateroscleróticas,

así como lesiones en bebés nacidos prematuramente. Las proantocianidinas son buenos inhibidores de la peroxidación lipídica, con actividades inhibitorias similares o superiores a las de los antioxidantes estándar trolox y vitamina E.<sup>272,312</sup>

Por otro lado, el exceso de radical libre de NO y O<sub>2</sub> (NO • y ONOO-) puede estar implicado en la fisiopatología de los trastornos neurológicos, como el accidente cerebrovascular, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington. Algunos estudios sugieren que las OPCs no reaccionan directamente con ONOO-, pero sí con intermediarios oxidantes y nitrantes.<sup>272,313</sup>

### **c) Acción anticancerígena**

La muerte celular es llevada a cabo por diferentes vías: apoptosis y necrosis. La apoptosis es una forma de muerte celular programada que se caracteriza por la contracción celular, la condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN internucleosómico y la formación de cuerpos apoptóticos. El proceso de muerte apoptótica está regulado por varios genes, algunos de los cuales la promueven (Bax, Bcl-xs, c-myc, p53, cfos) y otros la inhiben (Bcl-2, Bcl-xL). La regulación inadecuada de la apoptosis contribuye a trastornos, como cáncer, infección viral y accidente cerebrovascular.<sup>272,314</sup> Los estudios también han demostrado que varios agentes quimiopreventivos contra el cáncer pueden inducir la apoptosis, mientras que varios agentes promotores de tumores inhiben la apoptosis. El estrés oxidativo está involucrado en la activación de los factores de transcripción y el desencadenamiento de la apoptosis.<sup>272,315,316</sup> En consecuencia, el estrés oxidativo ha sido implicado tanto en la apoptosis como en la patogénesis del cáncer, y por lo tanto, los antioxidantes, incluidas las

proantocianidinas oligoméricas, pueden ser útiles como agentes quimiopreventivos y/o anticancerígenos. Algunos estudios han mostrado como algunos componentes de las OPCs pueden desencadenar la apoptosis de células cancerígenas,<sup>317,318</sup> mientras que otros hablan de la modulación del gen Bel-2 y p-53.<sup>272,319</sup>

#### **d) Acción en enfermedades cardiovasculares**

Las proantocianidinas exhiben propiedades cardioprotectoras a través de diferentes mecanismos de acción, incluida la inhibición de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), la relajación de los vasos sanguíneos dependiente del endotelio, la inhibición de la agregación plaquetaria y la trombosis, y la protección contra la lesión por isquemia-reperfusión.<sup>272,320</sup>

- **Inhibición de la oxidación de LDL**

El estrés oxidativo juega un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis. La LDL oxidada es absorbida rápidamente por los macrófagos, convirtiéndolos en células espumosas que sirven como precursores de placas fibrosas.<sup>272,321</sup> Las OPCs son capaces de inhibir la oxidación de LDL como hemos dicho anteriormente, por lo que previenen la formación de placas de ateroma.

- **Relajación dependiente del endotelio de los vasos sanguíneos**

El óxido nítrico (NO•, denominado factor relajante derivado del endotelio), se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina por acción de NOS. Además de su efecto vasodilatador sobre el endotelio vascular, el NO• puede proteger al LDL de la oxidación, inhibir la agregación plaquetaria y disminuir la adhesión de los

leucocitos al endotelio.<sup>272,320</sup> La actividad de las OPCs se debe a la vasodilatación por la estimulación de la producción de NO• por las células endoteliales.

Por otro lado, el sistema renina-angiotensina (RAS) es una cascada bioenzimática que desempeña un papel importante en la homeostasis cardiovascular al influir en el tono vascular, el equilibrio hidroelectrolítico y el sistema nervioso simpático. Los puntos comunes de la posible intervención terapéutica son la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y los antagonistas del receptor de angiotensina. Ambos mecanismos de acción se han descrito para las proantocianidinas. La actividad inhibidora de la ECA de las procianidinas aumenta con el grado de polimerización.<sup>272,321-324</sup>

- **Inhibición de la agregación y trombosis de plaquetas**

Un endotelio saludable secreta NO• y prostaciclina, lo que impide la adhesión de las plaquetas. Sin embargo, cuando el endotelio se daña y las fibras de colágeno subyacentes quedan expuestas, las plaquetas se activan y se adhieren al endotelio. Por lo tanto, las plaquetas contribuyen a la aterosclerosis mediante la incorporación en la lesión en desarrollo. Varios estudios en humanos investigaron la actividad inhibidora de las OPCs sobre la activación plaquetaria.<sup>272,325-328</sup>

- **Protección contra lesiones por isquemia-reperfusión**

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un papel importante en la patogénesis de la lesión tisular inducida por isquemia. La restitución temprana del flujo sanguíneo a los tejidos isquémicos es esencial para detener la progresión de la lesión celular asociada con la disminución del suministro de oxígeno y

nutrientes. Sin embargo, la reperfusión de tejidos isquémicos inicia una compleja serie de reacciones que lesionan los tejidos.

Algunos estudios mostraron una reducción en el daño por isquemia-reperfusión cuando las ratas se suplementaron durante tres semanas con procianidinas de semillas de uva, lo cual indica un efecto beneficio de las OPCs a este nivel.<sup>272,329-331</sup> Un estudio sugirió que las propiedades cardioprotectoras de las semillas de uva podrían atribuirse en parte a su capacidad de inhibir los factores proapoptóticos JNK-1 y c-Jun.<sup>272,329</sup>

# OBJETIVOS

## 3.OBJETIVOS

### Objetivo general

El objetivo de este estudio es evaluar la efectividad del nuevo suplemento nutricional hecho a base de proantocianidinas oligoméricas (OPC) y vitamina C en la respuesta del tejido para prevenir la gingivitis inducida (mediante el cese del cepillado dental) en sujetos sanos tras 21 días de uso.

Hipotetizamos un estado saludable del tejido periodontal en el grupo de estudio frente a la gingivitis en el grupo de control.

### Objetivos específicos

1. Valoración del índice de Løe y Silness como indicador de la efectividad del nuevo suplemento nutricional hecho a base de proantocianidinas oligoméricas (OPC) y vitamina C en la respuesta del tejido para prevenir la gingivitis inducida (mediante el cese del cepillado dental) en sujetos sanos tras 21 días de uso.
2. Valoración del índice de sangrado gingival como indicador de la efectividad del nuevo suplemento nutricional hecho a base de proantocianidinas oligoméricas (OPC) y vitamina C en la respuesta del tejido para prevenir la gingivitis inducida (mediante el cese del cepillado dental) en sujetos sanos tras 21 días de uso.
3. Valoración del índice de placa de Turesky como indicador de la efectividad del nuevo suplemento nutricional hecho a base de proantocianidinas

oligoméricas (OPC) y vitamina C en la respuesta del tejido para prevenir la gingivitis inducida (mediante el cese del cepillado dental) en sujetos sanos tras 21 días de uso.

4. Valoración de los cambios de luminosidad o brillo de la encía como indicador de la efectividad del nuevo suplemento nutricional hecho a base de proantocianidinas oligoméricas (OPC) y vitamina C en la respuesta del tejido para prevenir la gingivitis inducida (mediante el cese del cepillado dental) en sujetos sanos tras 21 días de uso.



# MATERIAL Y

# MÉTODO

## 4. MATERIAL Y MÉTODO

### 4.1. TIPO DE ENSAYO Y RESUMEN DEL DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un ensayo clínico prospectivo, aleatorizado, a doble ciego, controlado con placebo de 21 días de duración, en 20 estudiantes voluntarios de la Facultad de Odontología de la Universidad de Sevilla.

La duración del estudio fue establecida en 21 días debido a que es el tiempo en que se puede llevar a cabo el estudio de los diferentes parámetros clínicos en la encía sin causar problemas irreversibles en ella. Esto es debido a que en la gingivitis se establecen diferentes etapas (lesión inicial, lesión temprana y lesión establecida). Ésta última se da entre los días 14 y 21, y es en la que podemos observar cambios en color, tamaño, textura, etc. sin provocar daños irreversibles. Una vez alcanzada esta etapa, si no se llevan a cabo medidas de higiene pueden empezar a aparecer signos de lesión avanzada que lleven a la destrucción periodontal en sujetos susceptibles de desarrollar enfermedad periodontal, siendo éste el motivo de no alargar durante más días nuestro estudio.<sup>332</sup>

Para detectar una diferencia de 0,75 en la variable principal (índice gingival de Løe y Sillness), asumiendo un error alfa de 0,05 y una potencia del 80%, así como una varianza de 0,9, se calculó un tamaño muestral de 20 sujetos de estudio.

El Comité de Ética de la Universidad de Sevilla aprobó el protocolo de estudio (Anexo 1). Antes de la participación, el propósito y los procedimientos se explicaron completamente a todos los voluntarios sanos y todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito de acuerdo con la Declaración de Helsinki (Anexo 2). El estudio se diseñó, realizó, analizó e informó de acuerdo con las pautas de “*Buenas prácticas clínicas*”. Un seguro de responsabilidad civil fue contratado

por parte de Laboratorios LACER, S.A. (Barcelona) con HDI Hannover International (España) Seguros y Reaseguros S.A. con número de póliza 130/002/001896 para asegurar el procedimiento del estudio hasta 24 meses tras su finalización (ANEXO 3).

El estudio fue registrado en <http://ClinicalTrials.gov> (Protocol Registration and Results System) con el número NCT02515929. Se puede acceder al protocolo si es necesario en <http://ClinicalTrials.gov>.

El estudio se llevó a cabo entre septiembre de 2013 y enero de 2014. El reclutamiento comenzó en septiembre y el inicio del estudio en los voluntarios se llevó a cabo en octubre de 2013. Después de los 21 días de seguimiento, se trataron los datos para obtener los resultados en enero de 2014.

Un único examinador determinó la evaluación de la elegibilidad del paciente para el estudio y la inscripción de los pacientes en el ensayo. Los pacientes elegibles para el estudio fueron asignados aleatoriamente de forma individual al tratamiento con suplementos nutricionales de proantocianidinas oligoméricas o grupos placebo mediante una lista informática generada por LACER S.A.

El estudio fue doble ciego, es decir, el examinador y el paciente no sabían a qué grupo estaban asignados. El proceso de enmascaramiento se estableció mediante la fabricación específica de la medicación. La forma, tamaño, color y sabor del tratamiento fue el mismo tanto en el comprimido del grupo control como del grupo experimental.

Los pacientes tenían que tomar el tratamiento experimental o con placebo cada noche después de la cena y después de un enjuague con agua. La píldora se mantuvo en la boca hasta la disolución completa. No se permitió beber ni comer

durante 30 minutos después de tomar el tratamiento. El tratamiento experimental consistió en 90 mg de cran exociano 408 (equivalente a 36 mg de OPC) y 120 mg de vitamina C, mientras que el grupo placebo estaba compuesto por una sustancia organoléptica similar pero libre de ingredientes activos. Ambos eran similares en apariencia. No se permitieron métodos de higiene complementarios durante los 21 días (cepillado de dientes, enjuagues o irrigación con cualquier producto o uso de hilo dental), lo que podría constituir un sesgo para el estudio.

En la etapa inicial del ensayo, se llevó a cabo una tartrectomía en cada paciente para regularizar la situación inicial. A cada paciente se le entregó la medicación suficiente para el desarrollo de todo el estudio e instrucciones para su correcta realización. Al inicio del tratamiento, tras la tartrectomía, se registró la interleucina 6 (IL6) del fluido crevicular y el brillo de la encía.

Se realizaron dos visitas de evaluación los días 14 y 21 del estudio para un examen clínico oral y para registrar el índice de Silness y Løe, el índice de sangrado gingival, el índice de placa de Turesky y proceder a una toma de muestra del fluido de crevicular de IL6, así como evaluar los cambios en el brillo de la encía. Así mismo, en cada visita se llevó a cabo el recuento de la medicación para verificar la correcta toma del compuesto y se preguntó si estaba aconteciendo algún elemento adverso.

A partir del momento de inicio del estudio, quedó prohibida la utilización de cualquier producto de aplicación local oral a los sujetos del estudio, si esto no se cumpliese o fuese necesario el uso de alguno, el paciente quedaría retirado del estudio y se cumplimentaría la hora del Cuaderno de Estudio "Final del estudio".

## 4.2. SELECCIÓN DE LOS SUJETOS

### 4.2.1. Número de sujetos

Se reclutaron un total de 20 alumnos voluntarios pertenecientes a la Facultad de Odontología de la Universidad de Sevilla, dirigidos y supervisados por el coordinador del estudio. Todos ellos cumplían unos criterios de selección acorde con los criterios de inclusión y exclusión establecidos en el estudio. Los historiales médicos y dentales se realizaron en la visita previa a la selección, y se seleccionaron los 20 participantes según los criterios mencionados.

### 4.2.2. Criterios de selección

- Criterios de inclusión
  - Sujetos mayores de 18 años, de ambos sexos.
  - Buen estado general de salud.
  - Mínimo 20 piezas dentales sanas y elegibles (dientes del índice periodontal de Ramjorf).
  - Firma del consentimiento informado antes de iniciar el estudio.
- Criterios de exclusión
  - Enfermedad periodontal, definido como bolsas  $\geq 4$  mm y/o sangrado positivo al sondaje.
  - Embarazo o periodo de lactancia.
  - Portador de prótesis fijas o removibles.
  - Patología tumoral en cavidad oral.
  - Toma de antibióticos (periodo libre dos meses previo inicio de

estudio).

- Hipersensibilidad a frutos rojos en general.
- Xerostomía.
- Fumador activo.
- Patologías infecto-contagiosas.
- Patología/s con repercusión sistémica grave.
- Cualquier otro a juicio del investigador si cree que pone en peligro o riesgo al sujeto participante.
- Sujetos con fenilcetonuria o alergia al aspartamo.

La participación de los sujetos en el estudio pudo ser interrumpida a juicio del investigador, cuando éste lo considerase oportuno. Los sujetos deberían interrumpir el estudio en caso de cualquier complicación clínica que requiriese intervención activa, por incumplimiento del protocolo, por cualquier acontecimiento adverso no aceptable o el no deseo de continuar en el estudio por parte del voluntario.

#### **4.2.3. Seguimiento de interrupciones del tratamiento**

Tras la interrupción del tratamiento, se realizarían las siguientes valoraciones en una sola visita de control final cuando sea posible:

- Exploración física y oral general.
- Acontecimientos adversos.
- Medicación concomitante.

Cuando un sujeto decidiese interrumpir su participación en el estudio, el investigador siempre hubiese debido contactar con dicho sujeto para, en lo posible, obtener información sobre los motivos de la interrupción y posibles acontecimientos adversos. Siempre que sea posible, el sujeto acudiría a una visita de control final en el momento de la interrupción o al cabo de poco tiempo de la misma.

### **4.3. TRATAMIENTO A SEGUIR**

#### **4.3.1. Tratamiento del estudio**

En la visita basal a todos los sujetos incluidos se les realizó una anamnesis completa y despistaje de los criterios de inclusión y exclusión.

Se les explicó y dio respuesta a las dudas del estudio planteadas, previamente a la firma del consentimiento informado de participación en el estudio si así era su voluntad (Anexo 4 y 5).

Toda la medicación del estudio fue proporcionada por LACER, S.A. y conservada en un lugar seguro. Se obtuvo un certificado de calidad y un certificado de inocuidad de forma previa al comienzo del estudio (Anexo 6 y 7).

#### **a) Tratamiento experimental:**

Comprimidos orales desleíbles.

Posología: 1 comprimido al día.

Composición: 90 mg exocian cran 408 (equivalente a 36 mg OPCs) y 120 mg vitamina C (ácido ascórbico). Extracto de arándano, xilitol, manitol, neohesperidina, vainillina, sacarina sódica, aroma de mora, aerosil, talco,

estearato de magnesio vegetal.

#### **b) Tratamiento control**

Comprimidos orales desleíbles.

Posología: 1 comprimido al día.

Composición: Sustancia placebo con la misma composición organoléptica exenta de compuesto activo. Manitol, neohesperidina, sacarina sódica, vainillina, aroma de mora, aerosil, talco, estearato de magnesio vegetal, colorante carmín y laca de aluminio índigo carmín.

Se indicó la toma del comprimido (experimental o placebo) por la noche después de cenar, tras un enjuague oral con agua corriente. Posteriormente el comprimido se mantuvo en la boca hasta su total disolución. No se permitió beber ni comer durante 30 minutos después de tomar el tratamiento.

#### **4.3.2. Plan de tratamiento**

**Primera visita.** Los sujetos fueron asignados por aleatorización al grupo experimental o control, se les realizó una tartrectomía para descontaminar e igualar la situación de partida de los miembros de ambos grupos, se les entregó la medicación suficiente para la totalidad del estudio y se explicaron las instrucciones para su correcta cumplimentación.

**Segunda visita (día 14).** Se valoró el cumplimiento al tratamiento a través de unas preguntas realizadas a los sujetos de forma verbal y se realizaron los

controles pertinentes establecidos en cada visita y expuestos anteriormente.

**Tercera visita (final estudio, día 21).** Se valoró el cumplimiento al tratamiento a través de unas preguntas realizadas a los sujetos de forma verbal, se realizaron los controles pertinentes establecidos en cada visita y expuestos anteriormente y se recogió el producto no consumido.

Así mismo en cada visita se les recordó la existencia de declarar la medicación concomitante o el uso de medidas de higiene oral si hubiese acontecido.

#### **4.3.3. Duración del tratamiento**

Los sujetos fueron tratados durante 21 días desde la visita inicial. Previamente, se llevó a cabo una visita de selección de los voluntarios participantes.

#### **4.3.4. Responsabilidad y justificación de la medicación**

La medicación del estudio se mantuvo en un lugar seguro y, bajo la responsabilidad del investigador, sólo fue entregada a los sujetos del estudio. El investigador se responsabilizó del mantenimiento de un adecuado registro de la dispensación de la medicación del estudio. En caso de la destrucción accidental o deliberada de cualquier medicación se hubiese debido justificar.

#### **4.3.5. Otros tratamientos - Medicación concomitante**

La medicación que se considere necesaria para el bienestar del paciente pudo ser recetada por el investigador (excepto la que expresamente queda recogida en los criterios de exclusión). La administración de todas las medicaciones debió ser registrada en la sección correspondiente del Cuaderno de Recogida de Datos (Anexo 8).

Quedó totalmente prohibido el inicio o cambio de dosis de cualquier medicación que interaccionase con el tratamiento o que enmascarase e interfiriese en el resultado e interpretación del mismo, así como cualquier producto para higiene y tratamiento oral que no fuese recetado por el investigador correspondiente y en cuyo caso hubiese supuesto la eliminación del sujeto del estudio.

### **4.4. DESARROLLO DEL ENSAYO Y EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA**

#### **4.4.1. Visita 0 (basal): Día 0**

Todos los voluntarios que quisieron participar en el estudio se citaron para una valoración previa para poder seleccionar a los 20 sujetos participantes en el estudio. La valoración se llevó a cabo mediante la realización de:

- Historial médico.
- Exploración clínica oral (tejidos blandos y duros).
- Viabilidad piezas según Ramfjord: 1.6/2.1/2.4/3.6/4.1/4.4 (se registran las cuatro superficies lisas de cada diente)
- Valoración del estado de la encía/tejido alveolar ambas arcadas.

Si el paciente cumple los criterios de selección, se le explicarán los procedimientos del estudio y se solicitará la firma del consentimiento informado para participar en el mismo. Si el paciente otorga su libre consentimiento y voluntario de participación, será incluido en el estudio.

Se le entregará una hoja de información general al paciente en la cual se le recuerdan las pautas básicas a seguir junto a un diario del paciente.

#### **4.4.2. Visita 1: Día de Inicio del estudio (Día 1)**

El día de inicio del estudio se recordó a todos los pacientes las instrucciones del mismo, se la insistió en la imposibilidad de realizar medidas de higiene adicionales desde el momento de comienzo del estudio, así como la obligatoriedad de declarar la toma de fármacos. Una vez realizado esto se procedió a:

- Detartraje
- Entrega de medicación e instrucciones
- Entrega del diario del paciente
- Toma de muestra del fluido crevicular para el estudio de IL6 (situación inicial)
- Registro del brillo de la encía (situación inicial)

Tras llevar a cabo los procedimientos se le entregó al paciente la cita de la próxima visita (Tabla 22).

#### **4.4.3. Visita 2: Día 14**

Se llevó a cabo una exploración física oral de los tejidos blandos y duros. Se llevó a cabo el recuento de la medicación para verificar la correcta toma del compuesto, así como se preguntó si estaba aconteciendo algún elemento adverso

o había realizado algún método de higiene o había comenzado la toma de algún fármaco (Tabla 22).

En esta visita se llevó a cabo el registro de:

- Índice de placa de Turesky
- Índice gingival de Löe y Silness.
- Índice sangrado gingival
- Toma de muestra del fluido crevicular para el estudio de IL6
- Brillo de la encía

Tras el registro de las variables del estudio se revisó el diario del paciente y se entregó la cita para la próxima visita.

#### 4.4.4. Visita 3: Día 21 (Final estudio)

Se llevó a cabo una exploración física oral de los tejidos blandos y duros. Se llevó a cabo el recuento de la medicación para verificar la correcta toma del compuesto, así como se preguntó si estaba aconteciendo algún elemento adverso o había realizado algún método de higiene o había comenzado la toma de algún fármaco (Tabla 22).

En esta visita se llevó a cabo el registro de:

- Índice de placa de Turesky
- Índice gingival de Löe y Silness.
- Índice sangrado gingival
- Toma de muestra del fluido crevicular para el estudio de IL6
- Brillo de la encía

Tras la recogida de los datos de las diferentes variables para completar el estudio se verificó la cumplimentación total del “Cuaderno de Recogida de Datos”, se revisó y recogió el “Diario del Paciente” y se recogió la medicación sobrante. Una vez realizado todo esto, se llevó a cabo la Finalización del Estudio.

Tabla resumen de actividad por día de visita							
Visita	Detartraje	Entrega Documentación	Índice de placa de Turesky	Índice gingival de Løe y Silness	Índice sangrado gingival	Toma de muestra del líquido crevicular	Brillo o luminosidad de la encía
Visita 1 (Día 1)	X	X				X	X
Visita 2 (Día 14)			X	X	X	X	X
Visita 3 (Día 21)			X	X	X	X	

Tabla 22. Tabla resumen de actividad por día de visita

## 4.5. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

### 4.5.1. Historia médica y exploración física oral

Antes de la inclusión en el estudio, se interrogó al voluntario sobre su historia médica general y, en particular, sobre su historia dental, recogiendo todos los tratamientos previos que se hubiese realizado para poder realizar una historia médica y odontológica del voluntario.

Tras la entrevista se llevó a cabo un examen físico oral para realizar un odontograma y considerar si el voluntario cumplía los criterios de selección según el índice de Ramfjord, es decir, que las mediciones pudiesen ser llevadas a cabo en los dientes 1.6., 2.1, 2.4, 3.6, 4.1 y 4.4.<sup>199</sup>

Todo esto se llevó a cabo para asegurar el cumplimiento por parte de los sujetos incluidos de los criterios de inclusión y exclusión.

A partir de la visita basal (Día 0), en cada uno de los controles se realizó una exploración física oral (tejidos duros y blandos) para evaluar el estado bucodental del sujeto.

#### 4.5.2. Valoración del índice gingival de Løe y Silness:

- Se examinaron los dientes según el criterio de Ramfjord<sup>199</sup> (dientes: 1.6 - 2.1 - 2.4 - 3.6 - 4.1- 4.4) (Figura 4).
- Se registraron las cuatro superficies lisas de cada diente, esto sumó un valor máximo posible de 24 mediciones.
- El promedio del total de las mediciones efectuadas constituyó el índice gingival de Løe y Silness para toda la boca del individuo.
- Se empleó una sonda periodontal para el examen.

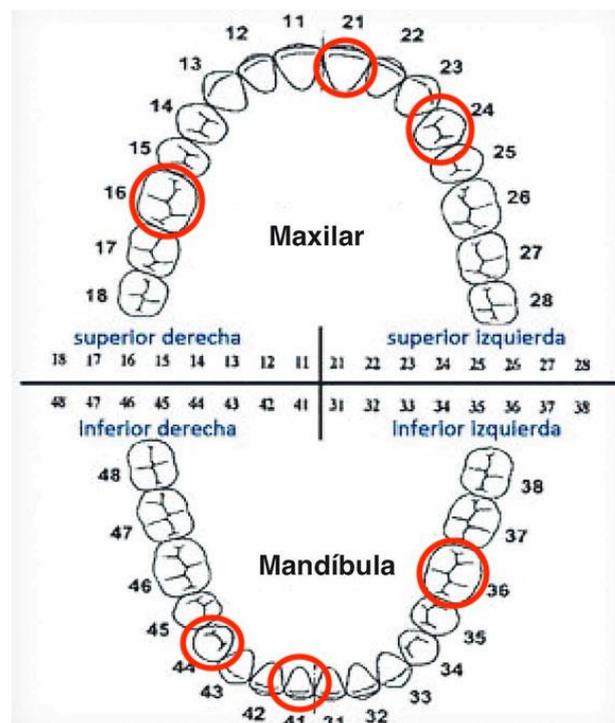


Figura 4. Odontograma con los dientes de Ramfjord marcados.

#### **4.5.3. Valoración del índice de sangrado gingival:**

Se empleó una sonda periodontal para el examen aplicando los siguientes criterios:

- 0 - Ausencia de inflamación.
- 1 - Inflamación leve, leve cambio en el color y edema gingival. No hay sangrado al sondaje.
- 2 - Inflamación moderada, enrojecimiento, edema e hipertrofia gingival. Sangra al sondaje (a los 10 segundos).
- 3 - Inflamación severa, marcado enrojecimiento e hipertrofia. Puede haber ulceraciones. Tiende al sangrado espontáneo.

Se realizó la media de este indicador en cada punto de evaluación.

#### **4.5.4. Índice de placa de Turesky**

Se examinaron las superficies vestibulares de los dientes anteriores, usando un enjuague bucal de fucsina básica como agente revelador de placa y un sistema de puntuación numérica desde 0 hasta 5.

- 0 - No hay placa
- 1 - Vetas independiente de placa en el margen cervical del diente.
- 2 - Banda delgada continua de placa (hasta 1 mm) en el margen cervical.
- 3 - Banda mayor a un milímetro de ancho, pero que cubre menos de una tercera parte de la corona.
- 4 - La placa cubre un tercio, pero no más de dos terceras partes de la corona.
- 5 - La placa cubre dos tercios o más de la corona.

Se realizó una media del valor de Turesky en cada diente explorado.

#### 4.5.5. Análisis de mediadores de la inflamación (IL-6)

Las muestras del fluido crevicular fueron recolectadas de las zonas interdentales (lingual, vestibular, mesial, y distal) de los cuatro cuadrantes orales para las piezas dentales 1.6, 2.1, 2.4, 3.6, 4.1 y 4.4 (Figura 5), mediante cinco tiras de papel prensado de dos centímetros de largo, especial para fluido crevicular. El tiempo de impregnación para cada paciente fue de cinco segundos e inmediatamente las tiras de papel fueron insertadas en microtubos Eppendorf de 0,5ml con 50 $\mu$ l de suero fisiológico a 4°C para su conservación. El transporte de las muestras al laboratorio biológico fue en nevera de corcho con placas térmica de hielo, donde a su llegada fueron congeladas a -80°C hasta su procesado en conjunto.

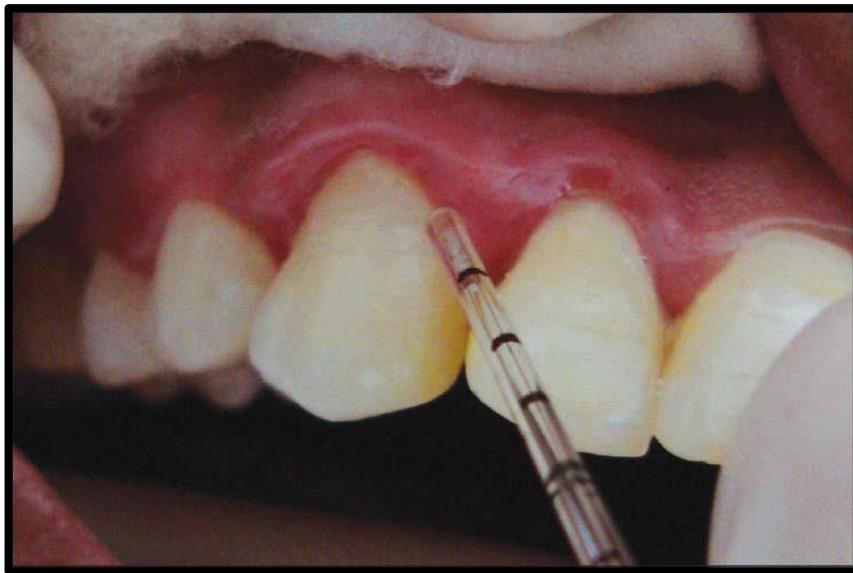


Figura 5. Tiras de papel prensado para recolección de fluido crevicular.

Posteriormente se procedió a analizar simultáneamente la concentración en pg/ml de Interleucina 6 (IL-6) presentes en cada muestra mediante

paneles BIOPLEX de 96 pocillos marca LUMINEX® (USA) (Figura 6), que están basados en la unión de la técnica de inmunofluorescencia directa (IFI) y la citometría de flujo (CMF), a través de esferas imantadas, dos anticuerpos específicos primarios y secundarios, y una enzima de sustrato coloreado conocido (Figura 7).

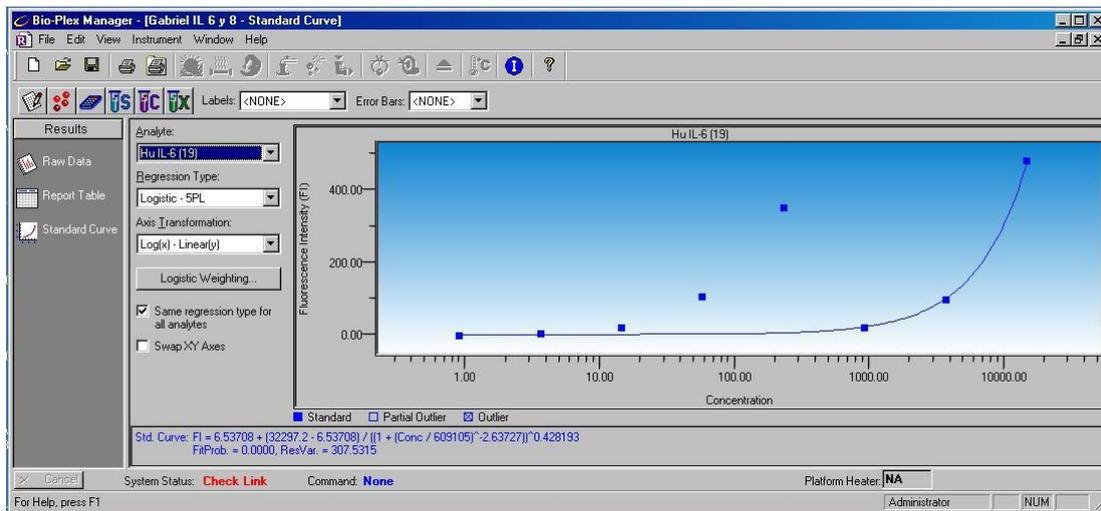


Figura 6. Curva estándar BIPLEX.



Figura 7. Protocolo técnico de Bioplex-Luminex.

#### 4.5.6. Luminosidad o brillo de la encía del paciente

La luminosidad de la encía fue tomada para identificar posibles cambios de coloración a nivel gingival. El enrojecimiento de la encía acompaña a la inflamación de este tejido, por lo que es un factor que podría ayudar a diferenciar cambios inflamatorios a este nivel (Figura 8).



Figura 8. Ejemplo de toma de color a un paciente con el SpectroShade.

La luminosidad de la encía fue registrada con el *SpectroShade™ Micro* de *MHT Optic Research AG (Suiza)* (Figura 8 y 9). Dicho instrumento está diseñado para la toma de color dental. No obstante, además de incluir las guías de color correspondientes a múltiples casas comerciales, el *SpectroShade™* tiene la posibilidad de medir la luminosidad de cualquier color, no sólo tonalidades de blanco, por lo que se usó para observar el cambio en la coloración de la encía dentro del mismo paciente tomando su color de referencia

y haciendo la comparación del mismo punto, en el área de la papila interincisiva (entre el 1.1 y 2.1) a cinco milímetros de la punta de ésta, en cada una de las visitas.

El registro de luminosidad se tomó realizando una foto intraoral con el *SpectroShade™ Micro*. Dicha fotografía fue archivada en el programa *SpectroShade Analysis* en una ficha creada para cada paciente.

El registro de la luminosidad del paciente se llevó a cabo en cada una de las visitas programadas para la realización del estudio. Dichas fotografías fueron renombradas asignándole a cada una de ellas un nombre en el cual se especificó el estudio al que corresponde (LACER S.A.), un número de asignación correspondiente al sujeto fotografiado y el día de la visita a la que corresponde con los números 1, 2 ó 3. Ej. Lacer 1.1 (foto correspondiente al primer día de estudio), Lacer 1.2 (foto correspondiente a la visita a los 15 días), etc.

Una vez obtenidas las tres fotografías correspondientes a las tres visitas de recogida de datos, éstas fueron comparadas con ayuda del programa de análisis *SpectroShade Analysis Software Version 2.30. (Suiza)*. La comparación se realizó seleccionando un punto en el área de la papila interincisiva a cinco milímetros de la punta de ésta, en las tres fotografías y seleccionando el valor correspondiente a la luminosidad (Figura 10).

Antes de tomar el registro en el paciente, el *SpectroShade™ Micro* tuvo que calibrarse tomando unas fotografías de color blanco y verde, cuyas referencias vienen insertadas en el pie cargador del equipo (Figura 11a y 11b). Una vez calibrado aparece en la pantalla calibrado OK (Figura 12a y 12b).



Figura 9. Pantalla de toma de imágenes de la encía del paciente.

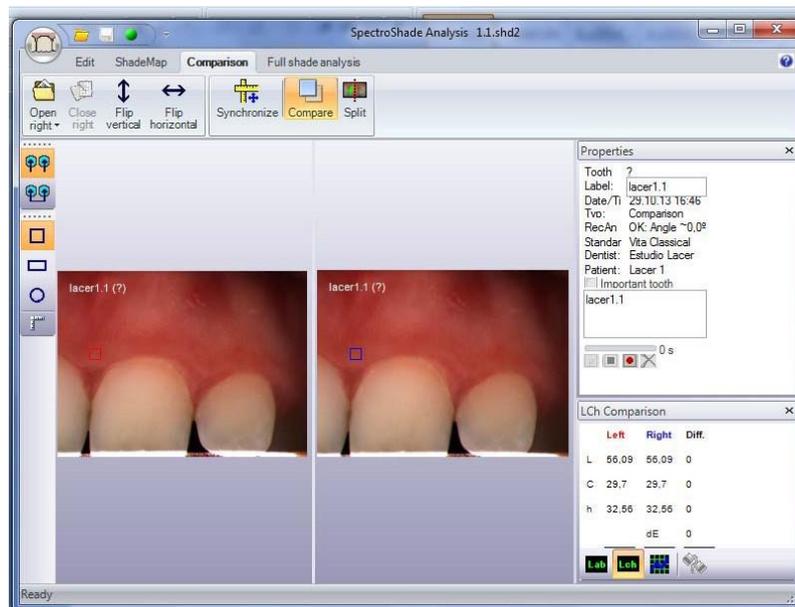
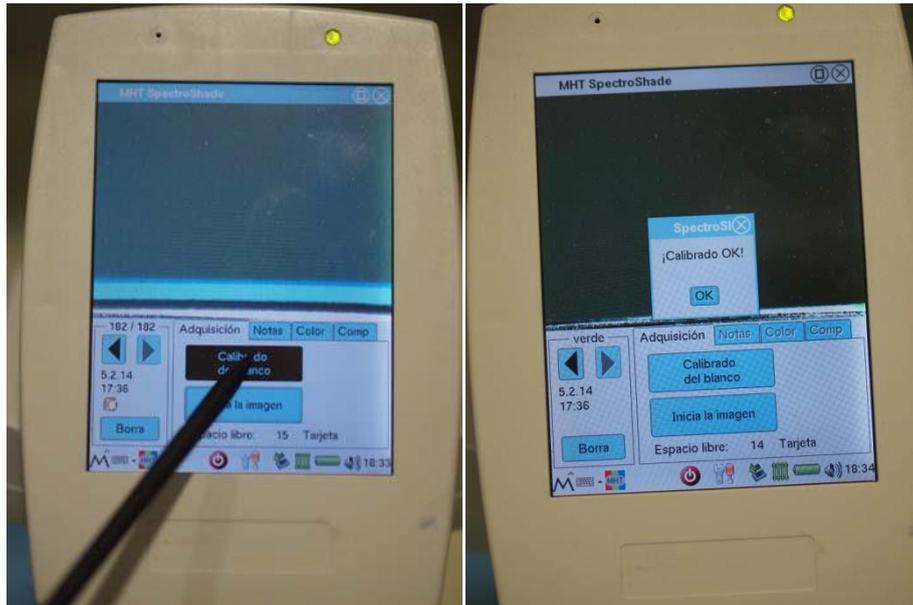


Figura 10. Análisis de la luminosidad de la encía con el programa Spectro Shade Analysis.

Los datos fueron registrados en tablas para posteriormente tratarse con el programa de análisis estadístico.



Figura 11 a y b. Toma de imágenes para el calibrado del equipo.



Figuras 12 a y b. Pantalla de calibrado del SpectroShade y pantalla de “Calibrado OK”.

## 4.6. ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

Los acontecimientos adversos que pudiesen acontecer durante la realización del estudio debían seguir una codificación específica y proceder a la activación de un protocolo desarrollado en el anexo que lleva por título “*Acontecimientos adversos*” (Anexo 9).

## 4.7. ASPECTOS ÉTICOS

### 4.7.1. Declaración de Helsinki

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con la declaración de Helsinki, y sus posteriores modificaciones, en estricta observancia de la legislación vigente. Tanto el equipo investigador como LACER, S.A. (a través de la persona encargada del seguimiento), se aseguraron de que el centro (Facultad de

Odontología de Sevilla) disponía de todos los recursos médicos y paramédicos para hacer frente y tratar cualquier incidente no deseado que pudiera presentarse (Anexo 2).

#### **4.7.2. Información y consentimiento del paciente**

El investigador se aseguró de que cada paciente recibiese una información, tanto verbal como escrita, adecuada y completa respecto a la naturaleza, propósito y posibles riesgos y beneficios del estudio. Del mismo modo, se notificó a los sujetos que tenían derecho a retirarse del estudio en cualquier momento y sin perjuicio de su posterior asistencia. El investigador se responsabilizó de obtener, de todos los sujetos, el consentimiento escrito a participar en el estudio previamente a la inclusión en el mismo (Anexo 4 y 5).

#### **4.7.3. Protección de los datos de los sujetos**

Los datos sobre los sujetos recogidos en el curso del estudio fueron documentados de manera anónima. Tanto en los Cuadernos de Recogida de Datos como en la base de datos, los sujetos fueron identificados por un número de paciente, sus iniciales, edad y sexo.

Si el conocimiento de la identidad del sujeto fuera necesario por razones reguladoras o de seguridad, se acordó mantener la confidencialidad tanto por parte de LACER, S.A. como por parte del investigador.

El investigador fue responsable de realizar una lista de todos los sujetos a los que se les asignó un número de paciente, incluyendo el número de paciente asignado, nombre completo, teléfono y última dirección conocida.

## **4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

### **4.8.1. Manejo de los datos**

El manejo de los datos se realizó mediante el uso del programa estadístico IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp. Released 2013. Se creó una base de datos que imitó el correspondiente Cuaderno de Recogida de Datos (Anexo 8) para facilitar el procedimiento de entrada de los mismos. Para cada variable se definió un rango mínimo y máximo, así como el nombre de la variable y de sus valores.

Los Cuadernos de Recogida de Datos fueron revisados y codificados. A cada Cuaderno de Recogida de Datos se le asignó un número interno consecutivo antes de la entrada de los datos, siendo cada uno identificado por el orden de entrada en el estudio.

Se llevó a cabo un procedimiento de control de calidad para asegurar la confianza de la base de datos. Un miembro del equipo fue el encargado de hacer una revisión final aleatoria, y confirmar que los datos introducidos eran correctos con los datos registrados en los Cuadernos de Recogida de Datos.

### **4.8.2. Valoración de los datos y consideraciones estadísticas**

El análisis de los parámetros de eficacia se realizó por "intención de tratar". El nivel de significación de los test estadísticos se fijó en  $p < 0,05$ .

En primer lugar, se llevó a cabo una descripción de las características basales de ambos grupos de tratamiento, utilizando porcentajes (variables cualitativas) y medias (variables cuantitativas) con sus intervalos de confianza correspondientes.

Para valorar la homogeneidad al inicio del estudio, se aplicó la prueba chi-cuadrado para las variables cualitativas. Para las variables cuantitativas se utilizó la prueba t-Student, tras asegurar la normalidad a través de la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Estas mismas pruebas se utilizaron para las comparaciones entre grupos en cada uno de los controles.

La comparación de la evolución de las distintas variables relacionadas con la valoración de la cicatrización se estudió, si los criterios de normalidad se cumplían, mediante el análisis de la varianza para medidas repetidas (ANOVA), caso contrario se utilizaría el test de Kruskal Wallis.

#### **4.8.3. Valoración de la seguridad**

La evaluación de la seguridad se efectuó a partir de todos los sujetos que cumplieren los criterios de inclusión y que hubiesen empleado al menos una dosis de la medicación del estudio.

Los acontecimientos adversos fueron tabulados y se realizaron comparaciones entre grupos mediante la prueba de chi-cuadrado.

#### **4.8.4. Tamaño de la muestra**

Para detectar una diferencia de 0,75 en la variable principal (índice gingival de Löe y Sillness), asumiendo un error alfa del 0,05 y una potencia del 80%, así como una varianza de 0,9, se calculó un tamaño muestral de 20 sujetos de estudio.



# RESULTADOS

## 5.RESULTADOS

### 5.1. COMPARACIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.

Un análisis estadístico entre los dos grupos de estudio, con 10 pacientes en cada grupo, en términos de sexo, edad (años), peso (kg), altura (cm), consumo de tabaco, alcohol y uso concomitante medicación, se llevó a cabo para garantizar la fiabilidad de los resultados. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio y el grupo de control, por lo que podemos decir que homogeneidad entre los grupos fue adecuada (Tabla 23, figuras 13 y 14).

No se registraron complicaciones ni acontecimientos adversos durante el estudio. Todos los participantes finalizaron el estudio con éxito en el tiempo reglado, es decir, no aconteció ningún abandono por parte de los sujetos de estudio ni ningún voluntario fue expulsado del mismo.

		<b>Experimental (n=10)</b>	<b>Control (n=10)</b>	<b>p</b>
<b>Sexo</b>	Hombres	2	5	0,674
	Mujeres	8	5	
<b>Edad</b>		24,6 ± 4,27	23,5 ± 1,64	0,525
<b>Peso (Kg)</b>		57,04 ± 9,33	66,6 ± 16,43	0,420
<b>Altura (cm)</b>		164,7 ± 8,02	169,3 ± 8,59	0,325
<b>Fumador</b>	Sí	0	0	1,000
	No	10	10	
<b>Alcohol</b>	Sí	1	1	1,000
	No	9	9	
<b>Tratamiento Médico</b>	Sí	1 (ACO)	0	0,875
	No	9	10	

Tabla 23. Características del grupo de sujetos de estudio. ACO: anticonceptivos orales.

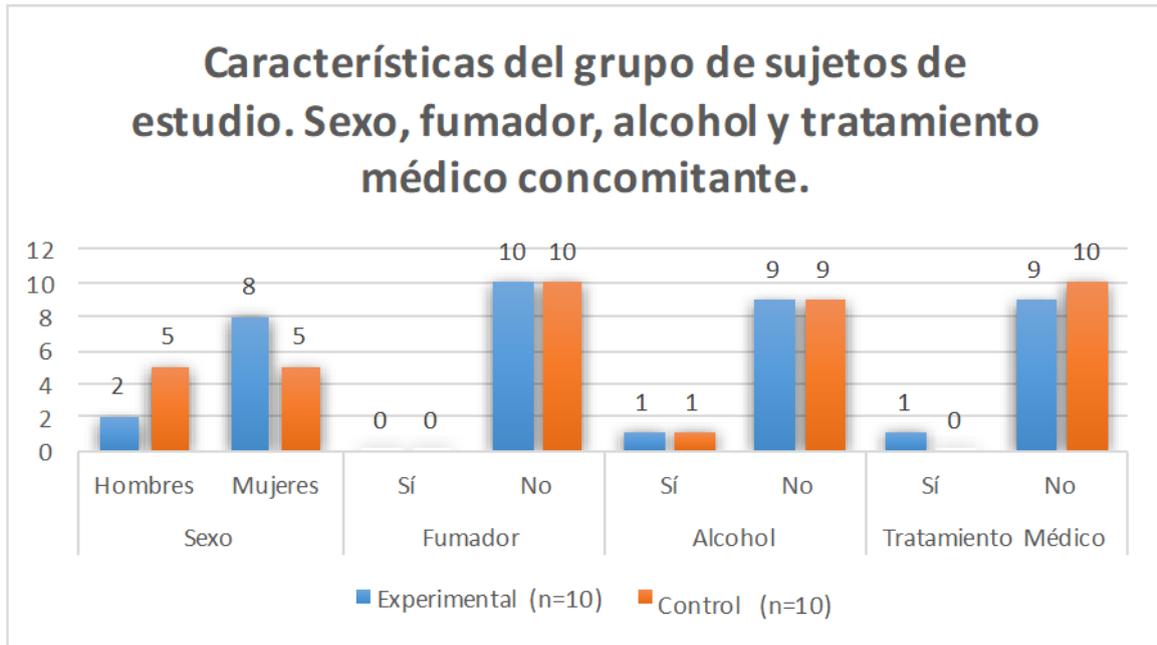


Figura 13. Características de los grupos de estudio. Sexo, fumador y tratamiento médico concomitante.

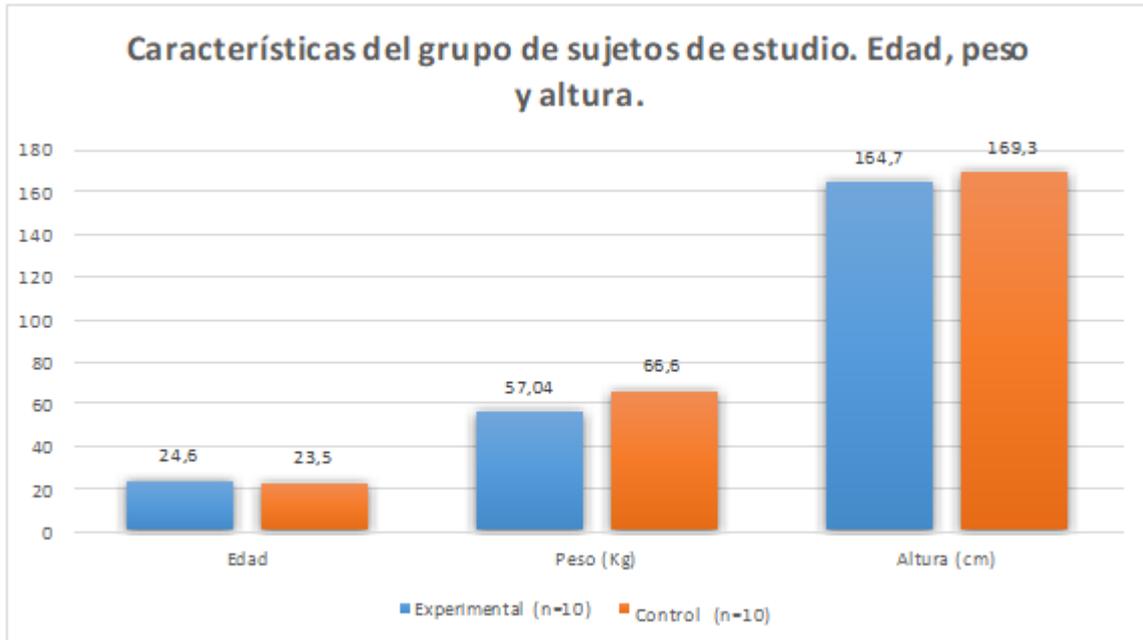


Figura 14. Características de los grupos de estudio. Edad, peso y altura.

## **5.2. ÍNDICES GINGIVALES DE LÖE Y SILNESS, DE SANGRADO Y DE PLACA EN LA SEGUNDA VISITA (14 DÍAS TRAS EL COMIENZO DEL TRATAMIENTO).**

El índice gingival de Löe y Silness (de 0-3 de menor a mayor inflamación gingival) fue mayor en el grupo de control ( $1,24 \pm 0,66$ ) que en el grupo experimental ( $0,65 \pm 0,58$ ), alcanzando una doble diferencia entre los dos grupos ( $p < 0,0001$ ). El índice de sangrado gingival también corrobora este hecho, ya que el índice de sangrado fue menor en el grupo experimental ( $0,91 \pm 0,84$ ) frente al grupo control ( $1,33 \pm 0,75$ ) ( $p < 0,005$ ). A diferencia de los valores obtenidos en los índices de sangrado gingival y de Löe y Silness, la cantidad de placa dental depositada en la superficie de los pacientes según el índice de placa de Turesky fue ligeramente mayor (33%) en el grupo experimental ( $1,68 \pm 0,79$ ) que en el grupo control ( $1,25 \pm 0,91$ ) ( $p < 0,006$ ) (Tabla 24 y Figura 15).

## **5.3. ÍNDICE GINGIVAL DE LÖE Y SILNESS, DE SANGRADO Y DE PLACA EN LA TERCERA VISITA (21 DÍAS TRAS EL COMIENZO DEL TRATAMIENTO).**

Los resultados obtenidos 21 días después del inicio del tratamiento mostraron la tendencia observada en la visita intermedia, aumentando la diferencia entre los grupos de estudio. El índice de Silness y Löe fue más alto en el grupo de control ( $1,48 \pm 0,60$ ) en comparación con el grupo experimental ( $0,97 \pm 0,54$ ), con una diferencia del 50% entre los grupos de estudio ( $p < 0,0001$ ). En el índice de sangrado gingival, el grupo control mostró mayor hemorragia

(1,61±0,66) que el grupo experimental (0,98± 0,67) ( $p < 0,0001$ ). Sin embargo, la deposición de placa fue más alta en el grupo experimental (3,35±1,59) que en el grupo de control (1,68±1,43) según el índice de placa de Turesky ( $p < 0,0001$ ) (Tabla 24 y Figura 15).

TEST	Visitas de Evaluación	Experimental	Control	p
Índice Løe y Silness	Día 14	0,65 ± 0,58	1,24 ± 0,66	0,0001(*)
	Día 21	0,97 ± 0,54	1,48 ± 0,60	0,0001(*)
Índice de sangrado gingival	Día 14	0,91 ± 0,84	1,33 ± 0,75	0,005(*)
	Día 21	0,98 ± 0,67	1,61 ± 0,66	0,0001(*)
Índice de placa	Día 14	1,68 ± 0,79	1,25 ± 0,91	0,006(*)
	Día 21	3,35 ± 1,59	1,68 ± 1,43	0,0001(*)

Tabla 24. Índice de Løe y Silness, Índice de Sangrado Gingival e Índice de Placa. (\*) diferencias estadísticamente significativas.

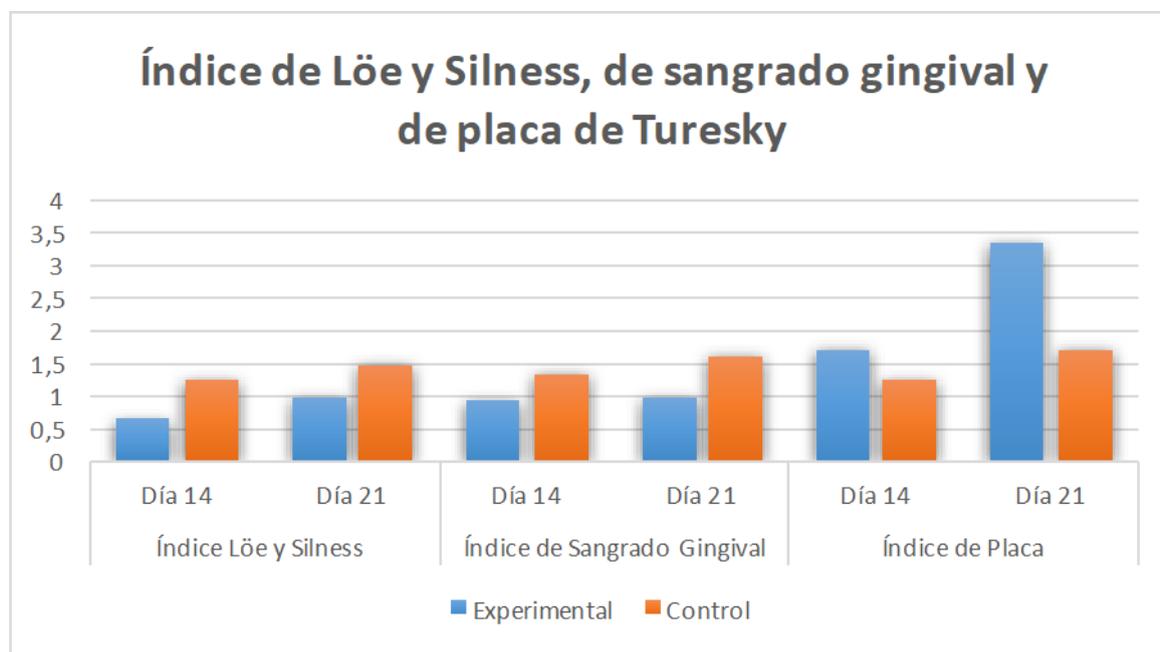


Figura 15. Gráfico comparativo del índice gingival de Løe y Silness, de sangrado gingival y de placa de Turesky llevados a cabo en nuestro estudio en la segunda visita (día 14) y tercera visita (día 21).

## 5.4. LUMINOSIDAD O BRILLO GINGIVAL

El brillo gingival se tomó en cada paciente utilizando *Micro SpectroShade Optic Research MHT AG (Suiza)*. Este valor se tomó al comienzo, en la visita intermedia y en la visita final. Los datos obtenidos de estas tres mediciones en cada paciente no mostraron diferencias estadísticamente significativas, siendo éstos en la visita inicial en el grupo experimental  $30,75 \pm 4,19$  frente a  $31,37 \pm 3,55$  en el grupo control; en la visita intermedia  $32,70 \pm 3,48$  para el grupo experimental frente a  $31,50 \pm 3,10$  del grupo control. Por último, en la tercera visita tampoco se encontraron diferencias significativas con  $32,57 \pm 4,72$  para el grupo experimental frente a  $31,22 \pm 2,52$  del grupo control. La diferencia en la luminosidad o brillo gingival desde el día 21 al día 14 de estudio tampoco obtuvo diferencias estadísticamente significativas con valores de  $-0,12 \pm 1,85$  en el grupo experimental frente a  $-0,28 \pm 1,92$  en el grupo control (p de 0,351 a 0,545) (Tabla 25 y Figura 16).

Brillo de la Encía	Experimental	Control	p
Día de inicio	$30,75 \pm 4,19$	$31,37 \pm 3,55$	0,351
Día 14	$32,70 \pm 3,48$	$31,50 \pm 3,10$	0,480
Día 21	$32,57 \pm 4,72$	$31,22 \pm 2,52$	0,425
Diferencia (Día 21-14)	$-0,12 \pm 1,85$	$-0,28 \pm 1,92$	0,545

Tabla 25. Luminosidad o brillo de la encía.

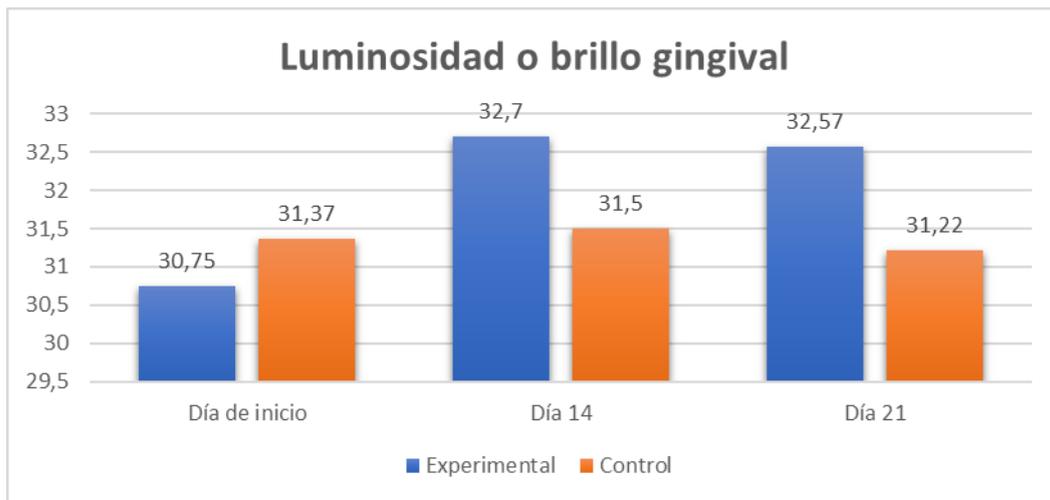


Figura 16. Gráfica comparativa entre los grupos de estudio en cuanto al brillo o luminosidad de la encía en las tres visitas registradas.

## 5.5. ESTUDIO DE IL6 EN EL FLUIDO CREVICULAR

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la situación inicial entre el grupo experimental ( $62,85 \pm 45,8$  pg/ml) y el grupo control ( $126,60 \pm 54,03$  pg/ml) y en las visitas posteriores. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la primera visita y la segunda visita ( $44,90 \pm 44,05$  pg/ml del grupo experimental frente a  $79,20 \pm 64,54$  pg/ml del control), y la primera y tercera visita ( $-40,70 \pm 45,02$  pg/ml del grupo experimental frente a  $-56,70 \pm 70,63$  pg/ml del control), aunque fue significativa entre la segunda visita y la tercera ( $-4,20 \pm 3,21$  pg/ml del grupo experimental frente a  $-22,00 \pm 21,03$  pg/ml del control) (Tabla 26 y Figura 17).

IL-6 en el fluido crevicular (pg/ml)	Experimental	Control	p
Día de Inicio	62,85 ± 45,8	126,60 ± 54,03	0,011(*)
Día 14	17,95 ± 13,02	47,40 ± 33,61	0,019(*)
Día 21	22,15 ± 15,14	69,40 ± 50,10	0,011(*)
Dif (Día 14-Inicio)	44,90 ± 44,05	79,20 ± 64,54	0,095
Dif (Día 21- Inicio)	-40,70 ± 45,02	-56,70 ± 70,63	0,245
Dif (Día 21- Día 14)	-4,20 ± 3,21	-22,00 ± 21,03	0,016(*)

Tabla 26. IL-6 en el líquido crevicular (pg/ml). (\*) diferencias estadísticamente significativas.

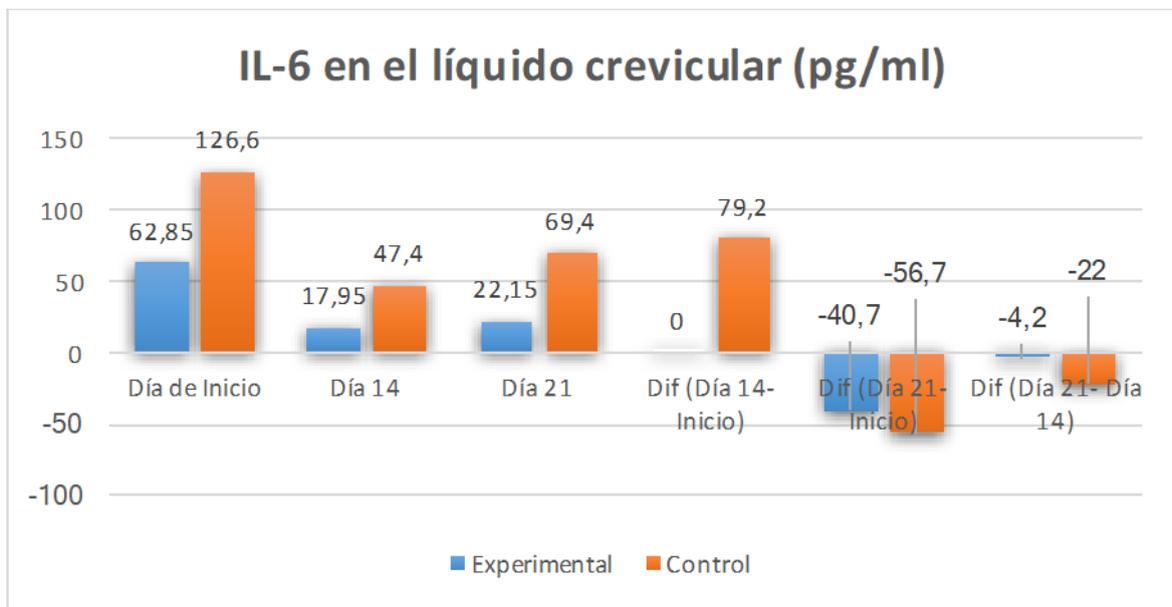


Figura 17. Gráfico comparativo de la cantidad de IL-6 en los grupos de estudios en las visitas registradas, así como la diferencia de los cambios entre los tres días.

# DISCUSIÓN

## 6.DISCUSIÓN

La gingivitis es una enfermedad inflamatoria de los tejidos de soporte dentales, afectando en primera instancia a la encía. Dicha afectación podría pasar a estadios más avanzados dando lugar a la aparición de periodontitis la cual lleva a la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes (encía, ligamento periodontal y hueso alveolar).<sup>1-4,90-112</sup>

La gingivitis es causada por el depósito de placa sobre la superficie de los dientes, siendo dicho depósito un factor irritante para la encía que desencadena inflamación y sangrado. Esta afectación es reversible si el paciente lleva a cabo higiene constante y correcta. Estas medidas de higiene están argumentadas en gran parte por una correcta técnica de cepillado, no existiendo, hasta el momento, alternativa válida para frenar el depósito de placa o su eliminación de forma mecánica.<sup>1-4,334-337</sup>

El fármaco utilizado en el estudio actual es un suplemento nutricional a base de arándano y frutos rojos rico en proantocianidinas oligoméricas (OPCs).<sup>228,334-338</sup> Las proantocianidinas han sido un tema de investigación muy estudiado en los últimos años, tal y como hemos detallado en la introducción, debido a sus poderosas actividades antioxidantes y anticancerígenas y debido a sus propiedades sistémicas antiinflamatorias, antimicrobianas y vasodilatadoras.

El efecto beneficioso de las proantocianidinas se atribuye a su capacidad para reducir el estrés oxidativo, la peroxidación de lípidos, la generación y eliminación de radicales libres y la oxidación de LDL.

Las propiedades atribuidas anteriormente a las proantocianidinas oligoméricas justificó testar este complemento a nivel oral, ya que, si tiene efectos

antimicrobianos, (debido a la inhibición de enzimas bacterianas extracelulares y la acción sobre el metabolismo microbiano a través de la inhibición de la fosforilación oxidativa<sup>270,283</sup>), y efectos antiinflamatorios y antioxidantes a nivel sistémico (por la eliminación de radicales libres, quelación de metales de transición, actividad e inhibición enzimática y extinción de singletes de oxígeno) podría interferir en el desarrollo de las enfermedades del tejido periodontal y en el depósito de placa sobre la superficie dental, constituyendo, de ser así, un paso adelante en las medidas de higiene y prevención de las enfermedades periodontales.

## 6.1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

Los resultados obtenidos tras llevar a cabo nuestro estudio clínico sobre el uso de las OPCs en la gingivitis sugieren que existe un efecto antiinflamatorio en los tejidos periodontales, ya que el índice gingival de Löe y Silness y el índice de sangrado gingival fue mayor en el grupo control frente al grupo experimental, existiendo diferencias estadísticamente significativas tanto en la visita realizada a los 14 días como en la llevada a cabo a los 21 días del comienzo el estudio, por lo que el grado de gingivitis inducida en nuestros sujetos de estudio fue menor en el grupo al que se administraba el compuesto activo frente al grupo tratado con placebo. Sin embargo, la cantidad de placa dental depositada en la superficie dental de los pacientes, registrada mediante el índice de Turesky, fue mayor en un 33% en el grupo experimental frente al grupo control. Este hecho nos indica que, a pesar de haber un depósito mayor de placa en los pacientes tratados con compuesto activo, la gingivitis inducida, y por tanto la reacción inflamatoria, fue menor en el grupo experimental, lo cual indica que la naturaleza bacteriana de la

placa dental o bien la respuesta del huésped pudo estar alterada, causando menos reacción en los tejidos periodontales, llevándonos a sospechar que este suplemento ciertamente pudiese tener un efecto antimicrobiano y/o antiinflamatorio. Este hecho podía ser explicado debido a la capacidad de las OPCs de inhibir a las enzimas microbianas por su carácter astringente, por la acción directa sobre el metabolismo microbiano debido al ácido tánico y/o por la capacidad de formación de complejos con iones metálicos necesarios para el crecimiento bacteriano. Por ello, estudios clínicos similares al nuestro cuyo objetivo sea la realización de cultivos bacterianos para identificar la naturaleza de la placa dental en presencia de OPCs, así como la virulencia o agresividad de las cepas presentes, pueden ser interesantes.

Sin embargo, aunque según los parámetros de observación clínica la gingivitis inducida y la reacción de los tejidos periodontales frente al depósito de placa fue menor, los valores IL-6 no estuvieron disminuidos, ya que aunque los resultados muestran tendencia a corroborar los datos obtenidos en los índices gingivales registrados a lo largo del desarrollo del estudio, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio en la toma de la muestra inicial, es decir no existía homogeneidad entre ellos en cuanto a esta variable. Este hecho puede constituir un sesgo en la posterior interpretación de los datos, provocando que solo podamos basarnos en los parámetros de observación clínica para afirmar un efecto real en la reacción de los tejidos periodontales frente al depósito de placa bacteriana en la gingivitis inducida. No obstante, aunque partimos de una diferencia inicial entre los grupos de estudio, la diferencia en la cantidad registrada de IL-6 en el líquido crevicular en el grupo

control fue mayor que en el grupo experimental en todas las visitas con diferencias estadísticamente significativas, siendo además las diferencias entre el registro llevado a cabo el día inicial y la segunda visita, así como entre la visita inicial y final no estadísticamente significativas, lo que significa que la producción de la IL-6 en los sujetos de cada grupo de estudio se mantuvo constante, no llegando a igualarse aun en presencia de una mayor cantidad de placa dental en el grupo experimental. Dentro de las diferencias en el registro de IL-6 entre las visitas, sólo la diferencia entre la visita intermedia y final muestran diferencias estadísticamente significativas siendo los valores en el grupo experimental de  $-4,20 \pm 3,21$  pg/ml frente a  $-22,00 \pm 21,03$  pg/ml en el grupo control. De igual manera, proponemos estudios similares llevados a cabo en humanos con gingivitis inducida en los que se estudien otros mediadores de la inflamación diferentes, asegurando homogeneidad en los grupos de estudios establecidos y ampliando el número de factores a estudiar para tener una visión más completa del comportamiento de estos mediadores en presencia de OPCs.

Tampoco podremos apoyarnos en los datos obtenidos de nuestra última variable a tratar, la luminosidad o brillo de la encía, la cual fue obtenida con el uso del *Micro SpectroShade Optic Research MHT AG (Suiza)*. No obtuvimos resultados estadísticamente significativos en la visita inicial, lo cual resultó positivo ya que marcaba la homogeneidad de los grupos en esta variable. No obstante, los resultados a lo largo del estudio, tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas en la visita intermedia y en la visita final. Estos datos podrían ser explicados por varios motivos.

El primero de ellos, podría ser pensar que no aconteció un cambio de

coloración en la encía de nuestros voluntarios en ninguno de los grupos. Sin embargo, sabemos por los parámetros clínicos que sí hubo una reacción de los tejidos periodontales a desarrollar gingivitis en ambos grupos, aunque con diferente magnitud, lo cual hubiese llevado a un enrojecimiento de la encía de nuestros voluntarios tal y como se describe entre los síntomas y signos de esta enfermedad.

El segundo motivo vendría dado por un error en la selección del parámetro de estudio seleccionado. Para llevar a cabo una medición del cambio de color de la encía de nuestros voluntarios seleccionamos el valor de los datos obtenidos en cuanto al brillo o luminosidad, ya que este concepto hace referencia a la cantidad de luz percibida, siendo un valor utilizado para determinar lo claro u oscuro de un color determinado. Para esta selección nos apoyamos en que el color base de la encía del paciente sería el mismo y lo que acontecería sería un oscurecimiento de la misma, sin embargo, a la luz de los resultados obtenidos proponemos a investigaciones futuras tomar como referencia otra variable aportada por el espectrómetro como el matiz o tonalidad, en la cual podría asumirse un cambio en la base del color de la encía del paciente o el estudio del croma o saturación, que determina la viveza o palidez de un color, su intensidad o pigmentación.

Y por último, un tercer motivo que explique estos resultados podría ser que la diferencia obtenida en los cambios de color en los pacientes sea muy leve y no suponga un factor determinante para arrojar resultados concluyentes como variable de estudio, bien por el tiempo de estudio clínico establecido (21 días), el cual no debíamos alargar para no provocar daños irreversibles en aquellos pacientes susceptibles de desarrollar enfermedad periodontal o bien porque el

cambio de coloración de la encía al ser un factor dependiente de la pigmentación de la mucosa sea personal y no se pueda estandarizar y extrapolar como una variable común dentro de un grupo de estudio.

## **6.2. EVIDENCIA BÁSICA MEDIANTE ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN VIVO* Y RELACIÓN CON NUESTROS RESULTADOS.**

Mohana y cols. publicaron un estudio en 2015 sobre el efecto de los OPC en la prevención y el tratamiento de la aterosclerosis. La oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (OxLDL) ha sido fuertemente sugerida como un factor clave en la patogénesis de la aterosclerosis.<sup>338</sup> Debido a la acción antioxidante de las proantocianidinas y la modulación de la diferenciación de macrófagos, Mohana y cols. informaron del beneficio del producto como prevención y tratamiento de la aterosclerosis.<sup>338</sup> La diferenciación de monocitos a macrófagos es un evento clave en la progresión de la aterosclerosis. La inhibición de este fenómeno formará la primera línea de defensa en la prevención y el tratamiento de la misma. Mohana y cols. estudiaron en este trabajo la diferenciación inducida por hipercolesterolemia entre monocitos y macrófagos *in vivo* (ratas Wistar) que conduce a la aterosclerosis y OxLDL, así como la diferenciación de monocitos inducida por M-CSF *in vitro*. El uso de OPCs disminuyó la diferenciación de monocitos a macrófagos disminuyendo los niveles de VCAM-I y MCP1 y regulando negativamente la vía inflamatoria en el estudio *in vivo*. En estudios *in vitro*, las OPCs disminuyeron la diferenciación evidente por la disminución en los marcadores de macrófagos, MMP 2 y 9 y PPAR $\gamma$ . Mohana y cols. concluyeron que las OPCs dirigen de forma efectiva y regulan negativamente

las etapas iniciales del desarrollo de la aterosclerosis, debido a entre otros motivos a la influencia sobre la vía inflamatoria, lo cual corrobora la acción antiinflamatoria del compuesto, tal y como sugieren nuestros resultados.

En el mismo año, Wang y cols. publicaron otro estudio en el que se abogaba por el mecanismo antiinflamatorio de las OPCs, corroborando los datos obtenidos por Mohana y cols. y nuestros resultados.<sup>338-339</sup> Diseñaron un estudio *in vivo* en modelos de ratones para investigar el efecto protector de los OPC contra la esteatosis y la lesión hepática inducida por el alcohol. Los resultados mostraron que OPC mejoró significativamente la dislipidemia inducida por el alcohol y la esteatosis hepática, aliviada al reducir los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), triglicéridos totales (TG), colesterol total (TC), colesterol de baja densidad (LDL-c), malondialdehído hepático (MDA), y aumentar los niveles de lipoproteína de alta densidad sérica (HDL-c) y superóxido dismutasa (SOD) del hígado. Investigaciones adicionales indicaron que las OPCs disminuyeron notablemente las expresiones de los genes de síntesis de lípidos y los genes de inflamación tales como proteína 1c de unión al elemento regulador de esteroides (Srebp-1c), proteína-2 (Srebp2), IL-1b e IL-6 y TNF- $\alpha$ . Además, Wang y cols. utilizaron la línea de células AML-12 para investigar los posibles mecanismos que indicaban que las OPCs podría aliviar la esteatosis hepática y el daño a través de la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) que implica estrés oxidativo. En conclusión, en este estudio se demostró un excelente efecto protector de las OPCs frente a la esteatosis y lesión hepática inducida por alcohol.

Estos estudios sugirieron que las OPC podrían modificar la expresión de

genes y mediadores de la inflamación, reduciendo la inflamación obtenida.<sup>338,339</sup> Nuestros resultados muestran diferencias estadísticamente significativas en la IL-6, sin embargo, las diferencias fueron significativas en el día de inicio del estudio, lo cual no nos permite tomar los datos de los días consecutivos como fidedignos por el sesgo que esto supone, tal y como hemos indicado anteriormente. Sin embargo, los datos muestran una tendencia a valores más bajos en el grupo experimental en cada visita y este hecho sugiere, como en el estudio de Wang y cols., que las OPCs podrían estar llevando a cabo una reducción en la producción de IL-6.

Además del efecto antiinflamatorio, en 2011, Löhrl y cols. publicaron un estudio in vitro sobre el efecto antimicrobiano de los OPC que actúan en la adhesión de *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) a las células KB (células de queratina formadoras de células tumorales para cultivos celulares).<sup>340</sup> Postularon que los OPC tenían un efecto antiadherente contra *P. gingivalis* en las células KB. Los resultados de este estudio mostraron que las OPC ejercen efectos antiadhesivos contra *P. gingivalis*, y concluyen que las OPC pueden ser útiles para la prevención de las enfermedades periodontales asociadas a *P. gingivalis*. Debido al estudio anterior, sospechamos que el efecto antiadherente modificó la placa de los sujetos en el grupo experimental, lo que hizo que la inflamación fuera más baja.

Lörh y cols. demostraron que los polifenoles interactúan con la superficie de la proteína, por ejemplo, actuando como un potente inhibidor de las gingipaínas (cisteína proteasas tipo tripsina), las cuales son las adhesinas localizadas en la superficie de *P. gingivalis* más potentes y que aportan mayor factor de virulencia a esta bacteria. El efecto de los polifenoles estudiados por Lörh y cols. se centra

predominantemente en la actividad contra la Arg-gingipaína (cisteína proteasas específica de la arginina) cambiando su funcionalidad y reactividad. Por lo tanto, las OPC principalmente interactúan con el proceso de adhesión inicial de las bacterias a la membrana celular. Este proceso podría extrapolarse a nuestro estudio, dándonos una explicación de nuestros resultados, ya que un efecto real en la inflamación de la encía tuvo lugar en nuestros pacientes, debido a que los resultados obtenidos en el índice gingival de Løe y Silness y el índice de sangrado gingival fueron más bajos en el grupo experimental. Nuestro estudio no incluye el análisis bacteriano, pero nuestros resultados lo respaldan debido a que en el grupo experimental los parámetros mostraron menos inflamación y menos respuesta inflamatoria ante la placa, lo que podría atribuirse, como hemos argumentado anteriormente, a su naturaleza. De igual manera, también podríamos atribuir este hecho a una alteración en la respuesta inmune del huésped tal y como hemos descrito anteriormente.

En concordancia con el estudio publicado por Lörh y su equipo en 2011, se han publicado otros estudios en años posteriores. Por ejemplo, en 2015 podemos encontrar un ensayo clínico *in vitro* llevado a cabo por Schmuck y cols. en el que se utilizó un extracto de *Rumex Acetosa* (RA1) con una mezcla definida de flavan-3-oles, proantocianidinas oligoméricas y flavonoides para estudiar su impacto en la adhesión de *P. gingivalis* a las células KB, ya que el extracto de proantocianidinas con RA1 exhibe actividad antiadhesiva contra *P. gingivalis* debido a la afinidad por las fimbrias de ésta.<sup>341</sup> El ensayo se llevó a cabo mediante citometría de flujo, microscopía de escaneo láser confocal y ensayo de adhesión *in situ* usando tejido bucal murino. Los resultados del estudio mostraron como la RA1 (5 a 15 µg/ml)

redujo la adhesión de *P. gingivalis* de una manera dependiente de la dosis en aproximadamente un 90%. Se confirmó que las proantocianidinas son responsables de este efecto antiadhesivo por la epicatequina-3-O-galato- (4 $\beta$ , 8) -epicatequina-3'-O-galato como compuesto principal. La RA1 y las proantocianidinas interactúan fuertemente con el factor de virulencia bacteriana Arg-gingipaína. El extracto de proantocianidinas con RA1 inhibió también la hemaglutinación, es decir, la aglutinación de los hematíes como respuesta biológica a la acción de determinadas agresiones, como la producida por ciertos virus. Los estudios de acoplamiento *in silico* indicaron que epicatequina-3-O-galato- (4 $\beta$ , 8) -epicatequina-3'-O-galato interactúa con el lado activo de Arg-gingipaína y hemaglutinina de *P. gingivalis*. En conclusión, el extracto de proantocianidinas con RA1 protege a las células de la infección por *P. gingivalis* al inhibir la adhesión bacteriana a la célula huésped concluyendo que la *Rumex Acetosa* (RA1) parece ser una candidata prometedora para futuras preparaciones citoprotectoras para productos bucales orales.<sup>341</sup>

En 2017 un estudio publicado por de Oliveira y cols. corroboraba estos resultados a partir de un estudio *in vitro* en el cual el extracto de *Limonium brasiliense* (compuesto rico en flavan-3-oles, misma estructura química que el compuesto utilizado para nuestro estudio) se testó para identificar el poder antiadherente contra la *P. gingivalis*.<sup>342</sup> El extracto de *Limonium brasiliense* (LBE) a 100  $\mu$ g/ml redujo significativamente la adhesión de *P. gingivalis* a las células KB en aproximadamente un 80%, mientras que sólo con una concentración de 20  $\mu$ g/ml redujo la actividad proteolítica de la Arg-gingipaína específica de arginina en aproximadamente un 75% (principal factor de virulencia de las *P. gingivalis*). Debido

a los resultados obtenidos, este estudio concluyó que el LBE podría tener un impacto en el desarrollo de productos de cuidado oral contra la periodontitis debido a su actividad inhibidora específica contra los factores de virulencia de *P. gingivalis*.<sup>342</sup>

Continuando con el efecto antimicrobiano, Widen y cols. publicaron un estudio sobre la actividad bacteriana de *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de zumo de grosella negra y espino amarillo en diferentes concentraciones en placas de agar frente a un grupo control de bacterias cultivadas en placas de agar con infusión cerebro corazón. Ni *S. sanguinis*, *S. gordonii* ni *S. mitis* crecieron en agar de espino amarillo en ninguna concentración.<sup>343</sup> Solo se pudo detectar *S. sanguinis* en el jugo de grosella negra a una concentración del 10% y con una inhibición promedio del 75% en relación con el crecimiento de *S. sanguinis* en el grupo control. Los datos demostraron que, a pH 7.0, *S. mutans* podría detectarse en el medio de crecimiento con espino amarillo a concentraciones de 10% y 20%. A pH 5,4, *S. mutans* podría identificarse en la concentración de espino amarillo al 10%. Mientras que a pH 4,4 no se pudo detectar crecimiento de *S. mutans* para ninguna concentración de espino amarillo. Se pudo detectar el crecimiento bacteriano de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans* y *P. aeruginosa* a una concentración del 10% de grosella negra o espino amarillo. Sin embargo, el crecimiento fue completamente inhibido a una concentración de zumo de bayas del 20% o superior para el medio de crecimiento que contiene grosella negra. Por el contrario, *S. aureus* creció 1,5 veces más en agar de espino amarillo al 10% en comparación con el agar de control. Los

datos del estudio identificaron efectos inhibidores antibacterianos similares para ambos jugos, concluyendo dicha publicación que dichos resultados podían tener implicaciones clínicas en el desarrollo de biopelículas, reduciendo los riesgos de caries dental y gingivitis, lo cual también está en concordancia con el estudio llevado a cabo en humanos sobre el estudio del crecimiento de *S. mutans* (anteriormente discutido) y con nuestros resultados.<sup>343</sup>

Ben Lagha y cols. publicaron también en 2015 un estudio sobre el efecto de las OPCs a través de los polifenoles del arándano azul (*Vaccinium angustifolium* Aiton) en *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) y la respuesta inflamatoria del huésped.<sup>344</sup> Obtuvieron como resultado que el extracto de arándano mostró actividad antibacteriana (CIM=1mg/mL) contra la bacteria periodontopatógena *F. nucleatum*. Esta propiedad puede ser el resultado de la capacidad de los polifenoles de arándano para quelar el hierro. Además, el extracto de arándano a 62,5 µg/mL inhibió la formación del biofilm de *F. nucleatum* en un  $87,5 \pm 2,3\%$ , así como inhibió la ruta de señalización NF-κB (vía de señalización fundamental en las enfermedades inflamatorias) en células U937-3xKB de manera dependiente de la dosis de extracto de arándano debido a la acción del ácido fenólico en la inhibición de la activación de la ruta de señalización (250, 125, 62,5 y 31,25 µg/ml del extracto de arándano redujeron la actividad de NF-κB en  $97 \pm 0,56\%$ ,  $88,6 \pm 0,9\%$ ,  $68,8 \pm 5,7\%$  y  $48,5 \pm 2\%$ , respectivamente). Además, un pretratamiento de macrófagos con extracto de arándano (62,5 µg/mL) inhibió la secreción de IL-1β, TNF-α e IL-6 en  $87,3 \pm 1,3\%$ ,  $80,7 \pm 5,6\%$  y  $28,2 \pm 9,3\%$  respectivamente, tras la estimulación con *F. nucleatum*, explicado por estos autores por la asociación de la inhibición de la vía de señalización NF-κB y la acción del ácido fenólico. Este hecho corrobora la

tendencia obtenida en los resultados de nuestro estudio con respecto al registro de la IL-6 en el fluido crevicular, sin poder afirmarlo debido a la falta de homogeneidad inicial entre los grupos que hemos descrito anteriormente. Sin embargo, los resultados expuestos por estos autores muestran que una modificación en la respuesta inflamatoria del huésped es acontecida en estudios *in vitro*, por lo que estudios clínicos en humanos son necesarios para corroborar esta conclusión.

Los resultados obtenidos en el estudio llevado a cabo por Ben Lagha y cols. concluyeron que esta doble acción antibacteriana y antiinflamatoria de los polifenoles de arándano rojo sugieren que pueden ser candidatos prometedores para nuevos agentes terapéuticos.<sup>344</sup> En el artículo de Ben Lagha y cols. se estudiaron parámetros concernientes a la reacción inflamatoria, así como en el estudio publicado por Zdarilová A. y cols. en 2010, en el cual se realizó un estudio *in vitro* con bayas de *Lonicera caerulea* (madreselva azul), ricas en compuestos fenólicos, particularmente ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas.<sup>345</sup>

Zdarilová y cols. se basaron para llevar a cabo su estudio en que las bacterias patógenas liberan una serie de agentes irritantes, incluido un lipopolisacárido (LPS) que activa las citoquinas proinflamatorias promoviendo una mayor actividad de los polimorfonucleocitos (PMN). La liberación de radicales libres derivados de PMN en un área gingival infectada afecta a la encía, al ligamento periodontal y al hueso alveolar. Los polifenoles suprimen una serie de señales inducidas por LPS y, por lo tanto, podrían ser eficaces contra la gingivitis. Para demostrar esto llevó a cabo una evaluación de los efectos de la fracción polifenólica de frutos de *L. caerulea* (PFLC, que contiene 77% de antocianinas) en el daño oxidativo inducido por LPS y la inflamación en fibroblastos gingivales humanos. La

aplicación de PFLC (10-50  $\mu\text{g/ml}$ ) redujo la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS), así como el agotamiento del glutatión intracelular (GSH) así como la peroxidación lipídica en células tratadas con LPS. El tratamiento con PFLC también inhibió la regulación al alza inducida por LPS de interleucina-1b (IL-1b), interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y suprimió la expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2). Estos resultados sugieren que dicho compuesto puede ser útil para atenuar el proceso inflamatorio desencadenado en las enfermedades periodontales a través del efecto antioxidante de los polifenoles (entre los cuales se encuentra el compuesto utilizado para nuestro estudio).<sup>345</sup>

En cuanto a los estudios clínicos llevados a cabo en humanos, encontramos que en marzo de 2015, Khairnar y cols. publicaron en el *Contemporary Clinical Dentistry* un ensayo clínico paralelo aleatorizado en humanos en el que se comparó un enjuague bucal de digluconato de clorhexidina al 0,2% versus un enjuague bucal de arándano al 0,6% en 50 sujetos con el objetivo de analizar el efecto sobre el *Streptococcus mutans* (*S. mutans*).<sup>346</sup> Para llevar a cabo este estudio, ambos grupos de estudio recibieron según la asignación realizada, 10 ml de enjuague de clorhexidina o 10 ml de enjuague bucal de arándano dos veces al día durante 14 días. Se tomaron dos muestras de placa dental de cada sujeto, una el primer día del estudio y otra tras 14 días de uso de los diferentes enjuagues. Las muestras se inocularon en placas de agar con sangre y se incubaron a 37° durante 24-48 horas. Pasado este tiempo se calculó el número de unidades formadoras de colonias con un contador digital. Ambos enjuagues tuvieron una reducción del número de colonias de *S. mutans* tras 14 días de uso, siendo una reducción del 69% en el grupo de enjuagues de clorhexidina y un 68% en el grupo del enjuague de

arándanos. Estos resultados son similares a los nuestros en cuanto a la colonización de esta bacteria en la placa, por lo que este estudio corrobora y confirma los resultados obtenidos en nuestro ensayo clínico, en el que planteamos la hipótesis de que la placa podría tener una composición bacteriana diferente, ya que existe menor reacción inflamatoria a la placa dental por parte del tejido periodontal.<sup>346</sup>

Hasta este momento, solo hemos encontrado un estudio publicado sobre el uso de las OPCs en la prevención de la gingivitis u otras enfermedades periodontales en humanos, a través del enjuague bucal de arándano, en la enfermedad periodontal,<sup>346</sup> por lo que nuevas investigaciones en humanos son necesarias.

### **6.3. APLICACIONES CLÍNICAS Y LÍNEAS FUTURAS.**

Tras la realización de nuestro estudio y la obtención de los resultados presentados anteriormente, LACER S.A. llevó a cabo la comercialización del producto bajo el nombre de *EnciLacer Oral comprimidos (C.N. 179113.9)* como un tratamiento coadyuvante y preventivo de las enfermedades de los tejidos periodontales debido a la capacidad de reducción de la inflamación y el sangrado gingival, así como para favorecer el mantenimiento de la salud de las encías sensibles y delicadas con tendencia al sangrado (Figura 18). Cada comprimido es de 1,5 g y contiene 120 mg de vitamina C, 110 mg de extracto seco de arándano rojo americano (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) con 55 mg de OPCs y 75 mg de Xilitol. La posología indicada del producto es un comprimido al día.



Figura 18. Presentación comercial del producto por parte de LACER S.A.

Una vez finalizado nuestro estudio con los resultados y las limitaciones presentadas, consideramos necesaria continuar esta línea de investigación testando el compuesto en otras enfermedades de los tejidos periodontales, como por ejemplo, en pacientes con periodontitis establecida para evaluar los efectos una vez comenzada la enfermedad. Este estudio podría arrojar nuevas soluciones o aportar un coadyuvante eficaz en el tratamiento de la enfermedad periodontal debido a las propiedades presentadas por las OPCs.

Así mismo, resultaría de gran interés llevar a cabo un estudio clínico para evaluar la influencia del producto en la naturaleza bacteriana de la placa dental, así como el estudio de las diferentes cepas que se encuentren para determinar el efecto en bacterias con distinto grado de agresividad.

De igual manera, son necesarios estudios similares al nuestro, en el que el

objeto principal del mismo sea la identificación de la posible respuesta inmune modificada por parte del huésped en presencia de OPCs. Para ello, sería de gran interés el estudio de los diferentes mediadores de la inflamación, así como de las vías de activación de la respuesta inmunológica.

Por último, instamos al uso de las variables de cambios de color en este tipo de estudio hasta que encontremos cómo realizar una medida estandarizada en cuanto al enrojecimiento de la encía para aportar nuevas variables de estudio al mundo de la investigación en Odontología.

# CONCLUSIONES

## 7. CONCLUSIONES

### Conclusión general

El suplemento nutricional hecho a base de proantocianidinas oligoméricas (extracto de arándano) y vitamina C induce una mejora en la salud de los tejidos periodontales en sujetos con gingivitis inducida tras 21 días de estudio.

### Conclusiones específicas

1. El índice de Løe y Silness mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo experimental y el grupo control, siendo los resultados del grupo experimental más bajos, lo cual indica un efecto positivo del compuesto tras 21 días de uso.
2. El índice de sangrado gingival mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo experimental y el grupo control, siendo el sangrado en el grupo experimental más bajo, lo cual indica un efecto positivo del compuesto tras 21 días de uso.
3. El índice de placa de Turesky mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo experimental y el grupo control, siendo la deposición de placa mayor en el grupo experimental, lo cual no indica un efecto positivo en la disminución de la cantidad de depósito de placa por parte del compuesto tras 21 días de uso.
4. El brillo o luminosidad gingival no mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo experimental y el grupo control, lo cual indica que el compuesto no influye en la coloración gingival entre ambos grupos de estudio tras 21 días de uso del compuesto.

# BIBLIOGRAFÍA

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Newman M, Takei H, Klokkevold P, Carranza F. Periodontología clínica de Carranza. 11ª ed. Caracas: Amolca; 2014.
2. Lindhe J, Karring T, Lang NP. Periodontología clínica e implantología odontológica. 5ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009.
3. Wolf H, Rateitschak K, Rateitschak E. Periodoncia. 3ª ed. Madrid: Masson; 2005.
4. Fombellida-Cortázar F, Martos-Molino F. Cirugía Mucogingival. 1ª ed. Madrid: Team Work Media España SL; 2004
5. Albucasis (Abu-al-Qasim). La chirurgie d'Albucasis. Trans. Lucien Leclerc. París: Bailliére; 1861.
6. Fauchard P. Le Chirurgien Dentiste; ou, traité des dents. Paris: Jean Mariette; 1728.
7. Berdmore T. A treatise on the disorders and deformities of the teeth and gums. London: John Exshaw; 1786.
8. Fischman SL. The history of oral hygiene: how far have we come in 6000 years. *Periodontol 2000*. 1997; Oct;15:7-14.
9. Gold SI. Periodontics. The past. Part (I). Early sources. *J Clin Periodontol*. 1985; Feb;12(2):79-97.
10. Gold SI. Periodontics. The past. Part (II). The development of modern periodontics. *J Clin Periodontol*. 1985; Mar;12(3):171-189.
11. Gold SI. Periodontics. The past. Microbiology. Part (III). *J Clin Periodontol*. 1985; Apr;12(4):257-269.
12. Guerini V. A history of dentistry from the most ancient times until the end of

- the eighteenth century. Philadelphia and New York: Lea and Febiger;1909.
13. Ainamo J, Löe H. Anatomical characteristics of gingiva. A clinical and microscopic study of the free and attached gingiva. *J Periodontol.* 1966; Jan-Feb;37(1):5-13.
  14. Ainamo J, Talari A. The increase with age of the width of attached gingiva. *J Periodontal Res.* 1976; Jul;11(4):182-188.
  15. Mattos CM, Santana RB. A quantitative evaluation of the spatial displacement of the gingival zenith in the maxillary anterior dentition. *J Periodontol.* 2008; Oct;79(10):1880-1885.
  16. Ainamo A. Influence of age on the location of the maxillary mucogingival junction. *J Periodontal Res.* 1978; May;13(3):189-193.
  17. Ainamo A, Ainamo J. The width of attached gingiva on supraerupted teeth. *J Periodontal Res.* 1978; May;13(3):194-198.
  18. Bowers GM. A study of the width of the attached gingiva. *J Periodontol.* 1963; 34(3):201-209.
  19. Cohen B. Morphological factors in the pathogenesis of periodontal disease. *Br Dent J.* 1959; 107:31–39.
  20. Kornman KS, Caffesse RG, Nasjleti CE. The effect of intensive antibacterial therapy on the sulcular environment in monkeys. Part I. Changes in the bacteriology of the gingival sulcus. *J Periodontol.* 1980; Jan;51(1):34-38.
  21. Caffesse RG, Kornman KS, Nasjleti CE. The effect of intensive antibacterial therapy on the sulcular environment in monkeys. Part II: Inflammation, mitotic activity and keratinization of the sulcular epithelium. *J Periodontol.* 1980; Mar;51(3):155-161.

22. Attström R, Graf-de Beer M, Schroeder HE. Clinical and histologic characteristics of normal gingiva in dogs. *J Periodontal Res.* 1975; Jul;10(3):115-127.
23. Gottlieb B, Orban B. Active and passive continuous eruption of teeth. *J Dent Res.* 1933;13:214.
24. Schroeder HE. The periodontium. *Handbook of microscopic anatomy.* Berlin: Springer-Verlag; 1986.
25. Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontol 2000.* 2000; Oct;24:28-55.
26. Weinmann JP, Meyer J. Types of keratinization in the human gingiva. *J Invest Dermatol.* 1959; 32(2):87-93.
27. Miller SC, Soberman A, Stahl SS. A study of the cornification of the oral mucosa of young male adults. *J Dent Res.* 1951; Feb;30(1):4-11.
28. Bosch FX, Ouhayoun JP, Bader BL, Collin C, Grund C, Lee I, Franke WW. Extensive changes in cytokeratin expression patterns in pathologically affected human gingiva. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1989;58(1):59-77.
29. Biolcati EL, Carranza FA Jr, Cabrini RL. Variations and changes in keratinization of clinically healthy human gingivae. *Rev Odontol (B Aires).* 1953; Oct;41(10):446-450.
30. Pöllänen MT, Salonen JI, Uitto VJ. Structure and function of the tooth-epithelial interface in health and disease. *Periodontol 2000.* 2003;31:12-31.
31. Yamasaki A, Nikai H, Ijuhin N, Takata T, Ito H. Cytochemical identification of lysosomal system of the rat junctional epithelium. *J Periodontal Res.* 1985;

- Nov;20(6):591-601.
32. Waerhaug J. Gingival pocket Anatomy, pathology, deepening and elimination. *Odontol Tidskr.* 1952;60(Suppl 1):1-186.
  33. Embery G, Waddington RJ, Hall RC, Last KS. Connective tissue elements as diagnostic aids in periodontology. *Periodontol 2000.* 2000; Oct;24:193-214.
  34. Embery G, Waddington R. Gingival crevicular fluid: biomarkers of periodontal tissue activity. *Adv Dent Res.* 1994; Jul;8(2):329-336.
  35. Cimasoni G. Crevicular fluid updated. *Monogr Oral Sci.* 1983;12:III-VII, 1-152.
  36. McKee MD, Zalzal S, Nanci A. Extracellular matrix in tooth cementum and mantle dentin: localization of osteopontin and other noncollagenous proteins, plasma proteins, and glycoconjugates by electron microscopy. *Anat Rec.* 1996; Jun;245(2):293-312.
  37. Berkovitz BK. The structure of the periodontal ligament: an update. *Eur J Orthod.* 1990; Feb;12(1):51-76.
  38. Ciancio SC, Neiders ME, Hazen SP. The principal fibers of the periodontal ligament. *Periodontics.* 1967; Mar-Apr;5(2):76-81.
  39. Gillespie BR, Chasens AI, Brownstein CN, Alfano MC. The relationship between the mobility of human teeth and their supracrestal fiber support. *J Periodontol.* 1979; Mar;50(3):120-124.
  40. Berkovitz BK, Shore RC. Cells of the periodontal ligament. In: Berkovitz BK, Moxham BJ, Newman HE, editors: *The periodontal ligament in health and disease.* London; Pergamon: 1982.
  41. Beertsen W, McCullough CAG, Sodek J: The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000.* 1997; 13:20-40.

42. Hassell TM, Stanek EJ 3rd. Evidence that healthy human gingiva contains functionally heterogeneous fibroblast subpopulations. *Arch Oral Biol.* 1983;28(7):617-625.
43. Grant DA, Bernick S. A possible continuity between epithelial rests and epithelial attachment in miniature swine. *J Periodontol.* 1969; Feb;40(2):87-95.
44. Roberts WE, Chamberlain JG. Scanning electron microscopy of the cellular elements of rat periodontal ligament. *Arch Oral Biol.* 1978;23(7):587-589.
45. Simpson HE. The degeneration of the rest of malassez with age as observed by the apoxestic technique. *J Periodontol.* 1965;Jul-Aug;36:288-291.
46. Tadokoro O, Maeda T, Heyeraas KJ, Vandevska-Radunovic V, Kozawa Y, Hals Kvinnsland I. Merkel-like cells in Malassez epithelium in the periodontal ligament of cats: an immunohistochemical, confocal-laser scanning and immuno electron-microscopic investigation. *J Periodontal Res.* 2002 Dec;37(6):456-463.
47. Bien SM. Hydrodynamic damping of tooth movement. *J Dent Res.* 1966 May-Jun;45(3):907-914.
48. Boyle PE. Tooth suspension. A comparative study of the paradental tissues of man and of the guinea pig. *J Dent Res.* 1938;17(1):37-46.
49. Picton DC, Davies WI. Dimensional changes in the periodontal membrane of monkeys (*Macaca irus*) due to horizontal thrusts applied to the teeth. *J Arch Oral Biol.* 1967 Dec;12(12):1635-1643.
50. Coolidge ED. The thickness of the human periodontal membrane. *J Am Dent Assoc.* 1937; 24(8):1260-1270.

51. Wills DJ, Picton DC, Davies WI. An investigation of the viscoelastic properties of the periodontium in monkeys. *J Periodontal Res.* 1972;7(1):42-51
52. Mühlemann HR, Houglum WM. The determination of tooth rotation centers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1954;7(4):392-394.
53. Kronfeld R. The biology of cementum. *J Am Dent Assoc* 1938;25(9):1451-1461.
54. Sodek J. A comparison of the rates of synthesis and turnover of collagen and non-collagen proteins in adult rat periodontal tissues and skin using a microassay. *Arch Oral Biol.* 1977;22(12):655-665.
55. McCulloch CA, Lekic P, McKee MD. Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament. *Periodontol* 2000. 2000 Oct;24:56-72.
56. Gibson WA, Fullmer HM. Histochemistry of the periodontal ligament. I. The dehydrogenases. *Periodontics.* 1966; Mar-Apr;4(2):63-70.
57. Gibson WA, Fullmer HM. Histochemistry of the periodontal ligament. II. The phosphatases. *Periodontics.* 1967; Sep-Oct;5(5):226-232.
58. Gibson WA, Fullmer HM. Histochemistry of the periodontal ligament. 3. The esterases. *Periodontics.* 1968; Apr;6(2):71-77
59. Bauer WH. Effect of a faultily constructed partial denture on a tooth and its supporting tissue, with special reference to formation of fibrocartilage in the periodontal membrane as a result of disturbed healing caused by abnormal stresses. *Am J Orthod Oral Surg.* 1941; 27(11):A640-A651.
60. Mühlemann HR, Zander HA, Halberg F. Mitotic activity in the periodontal tissues of the rat molar. *J Dent Res.* 1954 Aug;33(4):459-467.

61. Blaushild N, Michaeli Y, Steigman S. Histomorphometric study of the periodontal vasculature of the rat incisor. *J Dent Res.* 1992 Dec;71(12):1908-1912.
62. Bernick S. The innervation of the teeth and periodontium of the rat. *Anat Rec.* 1956; Jun;125(2):185-205.
63. Avery JK, Rapp R. An investigation of the mechanism of neural impulse transmission in human teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1959; Feb;12(2):190-198.
64. McCulloch CA, Melcher AH. Cell density and cell generation in the periodontal ligament of mice. *Am J Anat.* 1983 May;167(1):43-58.
65. Freeman E. The periodontium. In Ten Cate R, editor: *Oral histology.* 4<sup>a</sup> ed. St Louis: Mosby;1994.
66. Maeda T, Kannari K, Sato O, Iwanaga T. Nerve terminals in human periodontal ligament as demonstrated by immunohistochemistry for neurofilament protein (NFP) and S-100 protein. *Arch Histol Cytol.* 1990 Jul;53(3):259-265.
67. Gottlieb B. Biology of the cementum. *J Periodontol* 13: 1942.
68. Selvig KA. The fine structure of human cementum. *Acta Odontol Scand.* 1965; 23(4):423.
69. Ababneh KT, Hall RC, Embery G. Immunolocalization of glycosaminoglycans in ageing, healthy and periodontally diseased human cementum. *Arch Oral Biol.* 1998; Mar;43(3):235-46.
70. Ababneh KT, Hall RC, Embery G. The proteoglycans of human cementum: immunohistochemical localization in healthy, periodontally involved and

- ageing teeth. *J Periodontal Res.* 1999 Feb;34(2):87-96.
71. Rao LG, Wang HM, Kalliecharan R, Heersche JN, Sodek J. Specific immunohistochemical localization of type I collagen in porcine periodontal tissues using the peroxidase-labelled antibody technique. *Histochem J.* 1979; Jan; 11(1):73-82.
72. Bartold PM. Turnover in periodontal connective tissue: dynamic homeostasis of cells, collagen and ground substances. *Oral Dis.* 1995 Dec;1(4):238-253.
73. Jones SJ, Boyde A. A study of human root cementum surfaces as prepared for and examined in the scanning electron microscope. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1972;130(3):318-337.
74. Schroeder HE. *The periodontium.* Berlin: Springer-Verlag; 1986.
75. Jones ML, Aldred MJ, Hardy P. Tooth resorption in the two-stage transplantation technique: a case report. *Br J Orthod.* 1983 Jul;10(3):157-158.
76. Romanos GE, Schröter-Kermani C, Hinz N, Wachtel HC, Bernimoulin JP. Immunohistochemical localization of collagenous components in healthy periodontal tissues of the rat and marmoset (*Callithrix jacchus*). I. Distribution of collagen types I and III. *J Periodontal Res.* 1992 Mar;27(2):101-110.
77. Listgarten MA. A light and electron microscopic study of coronal cementogenesis. *Arch Oral Biol.* 1968 Jan;13(1):93-114.
78. Johnson RB, Pyllypas SP. A re-evaluation of the distribution of the elastic meshwork within the periodontal ligament of the mouse. *J Periodontal Res.* 1992 Jul;27(4 Pt 1):239-249.
79. Jones JC, Hopkinson SB, Goldfinger LE. Structure and assembly of

- hemidesmosomes. *Bioessays*. 1998; 20(6):488-494.
80. Zipkin J. The inorganic composition of bones and teeth. In Schraer H, editor: *Biological calcification*. New York: Appleton-Century-Crofts ;1970.
81. Nihei I. A study on the hardness of human teeth. *J Osaka Univ Dent Soc*. 1959; 4:1-20.
82. Saito M, Narayana AS. Signaling reactions induced in human fibroblasts during adhesion to cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res*. 1999; Jan;14(1):65-72.
83. Schroeder H. *Oral structural biology*. New York: Time Medical Publishers; 1991.
84. Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol 2000*. 2000; Oct;24:99-126.
85. Eastoe JE. The organic matrix of bone. In Bourne GH, editor: *The biochemistry and physiology of bone*, New York: Academic Press; 1956.
86. Glimcher MJ. The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. In: Avioli LV, Krane SM, editors: *Metabolic bone disease and clinical related disorders*. Philadelphia: Saunders; 1990.
87. Glimcher MJ, Friberg UA, Levine PT. The identification and characterization of a calcified layer of coronal cementum in erupted bovine teeth. *J Ultrastruct Res*. 1964; Feb;10:76-88.
88. Ritchey B, Orban B. The crests of the interdental alveolar septa. *J Periodontol*. 1953; 24(2):75-87.
89. G Caton J, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, S Kornman K, L Mealey B, Papananou PN, Sanz M, S Tonetti M. A new classification

- scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol.* 2018;89(Suppl 1):S1–S8.
90. Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. *J Periodontol.* 2018;89 (Suppl 1):S9–S16.
91. Murakami S, Mealey BL, Mariotti A, Chapple ILC. Dental plaque induced gingival conditions. *J Periodontol.* 2018;89(Suppl 1):S17–S27.
92. Holmstrup P, Plemons J, Meyle J. Non–plaque-induced gingival diseases. *J Periodontol.* 2018;89(Suppl 1):S28–S45.
93. Trombelli L, Farina R, Silva CO, Tatakis DN. Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *J Periodontol.* 2018;89(Suppl 1):S46–S73.
94. Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, Geisinger ML, Genco RJ, Glogauer M, Goldstein M, Griffin TJ, Holmstrup P, Johnson GK, Kapila Y, Lang NP, Meyle J, Murakami S, Plemons J, Romito GA, Shapira L, Tatakis DN, Teughels W, Trombelli L, Walter C, Wimmer G, Xenoudi P, Yoshie H. 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.* 2018;89(Suppl 1):S74–S84.
95. Herrera D, Retamal-Valdes B, Alonso B, Feres M. Acute periodontal lesions (periodontal abscesses and necrotizing periodontal diseases) and endo-periodontal lesions. *J Periodontol.* 2018;89(Suppl 1):S85–S102.

96. Fine DH, Patil AG, Loos BG. Classification and diagnosis of aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2018;89(Suppl 1):S103–S119.
97. Needleman I, Garcia R, Gkrantias N, Kirkwood KL, Kocher T, Iorio AD, Moreno F, Petrie A. Mean annual attachment, bone level and tooth loss: A systematic review. *J Periodontol.* 2018;89(Suppl 1):S120–S139.
98. Billings M, Holtfreter B, Papapanou PN, Mitnik GL, Kocher T, Dye BA. Age-dependent distribution of periodontitis in two countries: findings from NHANES 2009 to 2014 and SHIP-TREND 2008 to 2012. *J Periodontol.* 2018;89(Suppl 1):S140–S158.
99. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol.* 2018;89 (Suppl 1):S159–S172.
100. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, Flemmig TF, Garcia R, Giannobile WV, Graziani F, Greenwell H, Herrera D, Kao RT, Kerschull M, Kinane DF, Kirkwood KL, Kocher T, Kornman KS, Kumar PS, Loos BG, Machtei E, Meng H, Mombelli A, Needleman I, Offenbacher S, Seymour GJ, Teles R, Tonetti MS. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2018;89(Suppl 1):S173–S182.
101. Albandar JM, Susin C, Hughes FJ. Manifestations of systemic diseases and conditions that affect the periodontal attachment apparatus: case definitions and diagnostic considerations. *J Periodontol.* 2018;89(Suppl 1):S183–S203.
102. Cortellini P, Bissada NF. Mucogingival conditions in the natural dentition:

- Narrative review, case definitions, and diagnostic considerations. *J Periodontol.* 2018;89(Suppl 1):S204–S213.
103. Fan J, Caton JG. Occlusal trauma and excessive occlusal forces: Narrative review, case definitions, and diagnostic considerations. *J Periodontol.* 2018;89 (Suppl 1):S214–S222.
104. Ercoli C, Caton JG. Dental prostheses and tooth-related factors. *J Periodontol.* 2018;89 (Suppl 1):S223–S236.
105. Jepsen S, Caton JG, Albandar JM, Bissada NF, Bouchard P, Cortellini P, Demirel K, de Sanctis M, Ercoli C, Fan J, Geurs NC, Hughes FJ, Jin L, Kantarci A, Lalla E, Madianos PN, Matthews D, McGuire MK, Mills MP, Preshaw PM, Reynolds MA, Sculean A, Susin C, West NX, Yamazaki K. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2018;89(Suppl 1):S237–S248.
106. Araujo MG, Lindhe J. Peri-implant health. *J Periodontol.* 2018;89(Suppl 1):S249–S256.
107. Heitz-Mayfield LJA, Salvi GE. Peri-implant mucositis. *J Periodontol.* 2018;89(Suppl 1):S257–S266.
108. Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang H-L. Peri-implantitis. *J Periodontol.* 2018;89(Suppl 1):S267–S290.
109. Hämmerle CHF, Tarnow D. The etiology of hard- and soft-tissue deficiencies at dental implants: A narrative review. *J Periodontol.* 2018;89(Suppl 1):S291–S303.

110. Renvert S, Persson GR, Pirih FQ, Camargo PM. Peri-implant health, peri-implant mucositis and peri-implantitis: case definitions and diagnostic considerations. *J Periodontol.* 2018;89(Suppl 1):S304–S312.
111. Berglundh T, Armitage G, Araujo MG, Avila-Ortiz G, Blanco J, Camargo PM, Chen S, Cochran D, Derks J, Figuero E, Hämmerle CHF, Heitz-Mayfield LJA, Huynh-Ba G, Iacono V, Koo KT, Lambert F, McCauley L, Quirynen M, Renvert S, Salvi GE, Schwarz F, Tarnow D, Tomasi C, Wang HL, Zitzmann N. Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2018;89(Suppl 1):S313–S318.
112. Bergstrom J, Preber H. The influence of cigarette smoking on the development of experimental gingivitis. *J Periodontal Res.* 1986;21:688–676.
113. Peruzzo DC, Gimenes JH, Taiete T, Casarin RC, Feres M, Sallum EA, Casati MZ, Kantovitz KR, Nociti FH Jr. Impact of smoking on experimental gingivitis. A clinical, microbiological and immunological prospective study. *J Periodontal Res.* 2016;51:800–811.
114. Marshall-Day CD, Stephen RG. Periodontal disease; Prevalence and incidence. *J Periodontol.* 1955;18:291–299.
115. Löe H, Anerud, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol.* 1986;13:431–445.
116. Löe H, Morrison E. Periodontal health and disease in young people: Screening for priority care. *Int Dent J.* 1986;36:162–167.

117. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: An introduction. *Periodontol 2000*. 1997;14:9–11.
118. Schätzle M, Loe H, Bürgin W, Anerud A, Boysen H, Lang NP. Clinical course of chronic periodontitis. I. Role of gingivitis. *J Clin Periodontol*. 2003;30:887–901.
119. Schätzle M, Loe H, Lang NP, Bürgin W, Anerud A, Boysen H. The clinical course of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2004;31:1122–1127.
120. Lang NP, Schätzle MA, Loe H. Gingivitis as a risk factor in periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2009;36(Suppl.10):3–8.
121. Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000*. 2015;69:7–17.
122. World Health Organization. Constitution of WHO: Principles. [internet]. [Consultado 26 marzo 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/about/mission/es/>.
123. Loe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand*. 1963;21:533–551.
124. Brex MC, Schlegel K, Gehr P, Lang NP. Comparison between histological and clinical parameters during human experimental gingivitis. *J Periodontal Res*. 1987;22:50–57.
125. Brex MC, Gautschi M, Gehr P, Lang NP. Variability of histologic criteria in clinically healthy human gingiva. *J Periodontal Res*. 1987;22:468–472.
126. Bartold PM, Van Dyke TE. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. *Periodontol 2000*. 2013;62:203–217.

127. Papapanou PN, Neiderud AM, Sandros J, Dahlén G. Interleukin-1 gene polymorphism and periodontal status. A case-control study. *J Clin Periodontol.* 2001; May;28(5):389-396.
128. Folwaczny M, Glas J, Török HP, Fricke K, Folwaczny C. Prevalence of the chemokine receptor CCR5-Delta32 gene mutation in periodontal disease. *Clin Immunol.* 2003; Dec;109(3):325-329.
129. Folwaczny M, Glas J, Török HP, Tonenchi L, Paschos E, Malachova O, Bauer B, Folwaczny C. Prevalence of the -295 T-to-C promoter polymorphism of the interleukin (IL)-16 gene in periodontitis. *Clin Exp Immunol.* 2005; Oct;142(1):188-192.
130. Farina R, Tomasi C, Trombelli L. The bleeding site: a multi-level analysis of associated factors. *J Clin Periodontol.* 2013; Aug;40(8):735-742.
131. Bondon-Guitton E, Bagheri H, Montastruc JL. Drug-induced gingival overgrowth: A study in the French network of regional pharmacovigilance database. *J Clin Periodontol.* 2012; 39:513–518.
132. Hassel TM, Hefti AF. Drug-induced gingival overgrowth: Old problem, new problem. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991; 2:103–137.
133. Seymour RA, Thomason JM, Ellis JS. The pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol.* 1996; 23:165– 175.
134. Trackman PC, Kantarci A. Molecular and clinical aspects of drug induced gingival overgrowth. *J Dent Res.* 2015; 94:540–546.
135. Genco RJ, Ho AW, Grossi SG, Dunford RG, Tedesco LA. Relationship of stress, distress and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *J Periodontol.* 1999; Jul;70(7):711-723.

136. Kinane DF, Attström R. Advances in the pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005;32(Suppl. 6):130–131.
137. Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol.* 1965; 36:177–187.
138. U.S. Public Health Service NCHS. Periodontal Disease in Adults, United States 1960–1962. PHS Publ. No. 1000. Vol. Series 11 No. 12. Washington, DC: Government Printing Office; 1965.
139. U.S. Public Health Service NCHS. Periodontal Diseases and Oral Hygiene Among Children, United States. DHEW Publication No. (HSM) 72–1060. Vol. Series 11 No. 117. Washington, DC: Government Printing Office; 1972.
140. Stamm JW. Epidemiology of gingivitis. *J Clin Periodontol.* 1986; 13:360–370.
141. Bhat M. Periodontal health of 14-17-year-old US schoolchildren. *J Public Health Dent.* 1991; 51:5–11.
142. Dye BA. Global periodontal disease epidemiology. *Periodontol 2000.* 2012; 58:10–25.
143. Quirynen M, Dadamio J, Van den Velde S, De Smit M, Dekeyser C, Van Tornout M, Vandekerckhove B. Characteristics of 2000 patients who visited a halitosis clinic. *J Clin Periodontol.* 2009; 36:970–975.
144. Trombelli L, Scapoli C, Orlandini E, Tosi M, Bottega S, Tatakis DN. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. III. Response of “high responders” and “low responders” to therapy. *J Clin Periodontol.* 2004; 31:253–259.
145. Tonetti MS, Chapple ILC, Jepsen S, Sanz M. Primary and secondary prevention of periodontal and peri-implant diseases. *J Clin Periodontol.* 2015;

- 42(Suppl. 16):S1-S4.
146. Suzuki JB. Diagnosis and classification of the periodontal diseases. *Dent Clin North Am.* 1988; 32:195–216.
147. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. *Lab Invest.* 1976; 33:235–249.
148. Kistler JO, Booth V, Bradshaw DJ, Wade WG. Bacterial community development in experimental gingivitis. *PLoS One.* 2013; Aug 14;8(8):e71227.
149. Huang S, Li R, Zeng X, He T, Zhao H, Chang A, Bo C, Chen J, Yang F, Knight R, Liu J, Davis C, Xu J. Predictive modeling of gingivitis severity and susceptibility via oral microbiota. *ISME J.* 2014; Sep;8(9):1768–1780.
150. Park O-JJ, Yi H, Jeon JH, Kang SS, Koo KT, Kum KY, Chun J, Yun CH7, Han SH. Pyrosequencing analysis of subgingival microbiota in distinct periodontal conditions. *J Dent Res.* 2015; Jul;94(7):921-927.
151. Shaw L, Harjunmaa U, Doyle R, Mulewa S, Charlie D, Maleta K, Callard R, Walker AS, Balloux F, Ashorn P, Klein N. Distinguishing the signals of gingivitis and periodontitis in supragingival plaque: A cross-sectional cohort study in Malawi. *Appl Environ Microbiol.* 2016; Sep 16;82(19):6057-6067.
152. Heasman PA, McCracken GI, Steen N. Supportive periodontal care: The effect of periodic subgingival debridement compared with supragingival prophylaxis with respect to clinical outcomes. *J Clin Periodontol.* 2002; 29(Suppl. 3):163–172.
153. Mariotti A. Sex steroid hormones and cell dynamics in the periodontium. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1994; 5(1):27-53.

154. Mariotti A, Mawhinney MG. Endocrinology of sex steroid hormones and cell dynamics in the periodontium. *Periodontol 2000*. 2013; Feb;61(1):69-88.
155. Kumar PS. Sex and the subgingival microbiome: Do female sex steroids affect periodontal bacteria?. *Periodontol 2000*. 2013; 61:103–124.
156. Muhlemann HR. Gingivitis intermenstrualis. *Schweiz Mschr Zahnheilk*. 1948; 58:865–885.
157. Koreeda N, Iwano Y, Kishida M, Otsuka A, Kawamoto A, Sugano N, Ito K. Periodic exacerbation of gingival inflammation during the menstrual cycle. *J Oral Sci*. 2005; 47:159–164.
158. Sutcliffe P. A longitudinal study of gingivitis and puberty. *J Periodont Res*. 1972; 7(1):52–58.
159. Hefti A, Engelberger T, Buttner M. Gingivitis in Basel school children. *Helv Odontol Acta*. 1981; 25:25–42.
160. Mombelli A, Gusberti FA, van Oosten MA, Lang NP. Gingival health and gingivitis development during puberty. A 4-year longitudinal study. *J Clin Periodontol*. 1989; 16(7):451–456.
161. Hugoson A. Gingivitis in pregnant women. A longitudinal clinical study. *Odontologisk Revy*. 1971; 22:65–84.
162. Shourie V, Dwarakanath CD, Prashanth GV, Alampalli RV, Padmanabhan S, Bali S. The effect of menstrual cycle on periodontal health - a clinical and microbiological study. *Oral Health Prev Dent*. 2012;10(2):185-192.
163. Baser U, Cekici A, Tanrikulu-Kucuk S, Kantarci A, Ademoglu E, Yalcin F. Gingival inflammation and interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha levels in gingival crevicular fluid during the menstrual cycle. *J Periodontol*.

- 2009;80(12):1983–1990.
164. Becerik S, Ozcaka O, Nalbantsoy A, Atilla G, Celec P, Behuliak M, Emingil G. Effects of menstrual cycle on periodontal health and gingival crevicular fluid markers. *J Periodontol.* 2010; 81(5):673–681.
165. Shourie V, Dwarakanath CD, Prashanth GV, Alampalli RV, Padmanabhan S, Bali S. The effect of menstrual cycle on periodontal health – A clinical and microbiological study. *Oral Health Prev Dent.* 2012; 10(2):185–192.
166. Loe H. Periodontal changes in pregnancy. *J Periodontol.* 1965; 36:209–216.
167. Arafat AH. Periodontal status during pregnancy. *J Periodontol.* 1974; 45:641–643.
168. Figuero E, Carrillo-de-Albornoz A, Martin C, Tobias A, Herrera D. Effect of pregnancy on gingival inflammation in systemically healthy women: A systematic review. *J Clin Periodontol.* 2013; 40:457–473.
169. Holmstrup P, Plemons J, Meyle J. Non-plaque-induced gingival diseases. *J Periodontol.* 2018;89(Suppl 1):S28–S45.
170. Preshaw PM. Oral contraceptives and the periodontium. *Periodontol* 2000. 2013; 61:125–159.
171. Bissong M, Azodo CC, Agbor MA, Nkuo-Akenji T, Fon PN. Oral health status of diabetes mellitus patients in Southwest Cameroon. *Odontostomatol Trop.* 2015; 38:49–57.
172. Chapple ILC, Genco R; working group 2 of the joint EFP/AAP workshop. Diabetes and periodontal diseases: Consensus report of the Joint EFP/AAP workshop on periodontitis and systemic diseases. *J Periodontol.* 2013;84(Suppl. 4):S106-S112.

173. Lynch MA. Ship II. Initial oral manifestations of leukemia. *J Am Dent Assoc.* 1967; 75:932–940.
174. Dreizen S, McCredie KB, Keating MJ. Chemotherapy-associated oral hemorrhages in adults with acute leukemia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1984; 57:494–498.
175. Chapple IL, Saxby MS, Murray JA. Gingival hemorrhage, myelodysplastic syndromes, and acute myeloid leukemia. A case report. *J Periodontol.* 1999; 70(10):1247–1253.
176. Ryder MI. The influence of smoking on host responses in periodontal infections. *Periodontol 2000.* 2007; 43:267–277.
177. Scott DA, Singer DL. Suppression of overt gingival inflammation in tobacco smokers – Clinical and mechanistic considerations. *Int J Dent Hyg.* 2004; 2:104–110.
178. Nociti FH, Casati MZ, Duarte PM. Current perspective of the impact of smoking on the progression and treatment of periodontitis. *Periodontol 2000.* 2015;67:187–210.
179. Evans EP. Ascorbic Acid in Gingivitis. *Br Med J.* 1944; Sep 2; 2(4365): 321.
180. Gordon Campbell H, Cook RP. Treatment of Gingivitis with Ascorbic Acid. *Br Med J.* 1941; March 8;1(4183):360-361.
181. Oeffinger KC. Scurvy: more than historical relevance. *Am Fam Physician.* 1993; Sep 15;48(4):609-613.
182. Chapple IL, Milward MR, Dietrich T. The prevalence of inflammatory periodontitis is negatively associated with serum antioxidant concentrations. *J Nutr.* 2007; 137:657–664.

183. Woolfe SN, Hume WR, Kenney EB. Ascorbic acid and periodontal disease: A review of the literature. *J West Soc Periodontol Abstr.* 1980; 28:44–56.
184. Schätzle M, Land NP, Anerud A, Boysen H, Bürgin W, Loe H. The influence of margins of restorations of the periodontal tissues over 26 years. *J Clin Periodontol.* 2001; 28:57–64.
185. Seifert G, Miehle A, Haubrich J, Chilla R. *Diseases of the Salivary Glands.* Stuttgart: Thieme Medical Publishers; 1986:71–77.
186. Turner MD. Hyposalivation and xerostomia: Etiology, complications and medical management. *Dent Clin North Am.* 2016; 60:435–443.
187. Mizutani S, Ekuni D, Tomofuji T, Azuma T, Kataoka K, Yamane M, Iwasaki Y, Morita M. Relationship between xerostomia and gingival condition in young adults. *J Periodontal Res.* 2015; Feb;50(1):74-79.
188. Wagaiyu EG, Ashley FP. Mouthbreathing, lip seal and upper lip coverage and their relationship with gingival inflammation in 11–14 year-old schoolchildren. *J Clin Periodontol.* 1991; Oct;18(9):698-702.
189. Hassel TM, Hefti AF. Drug-induced gingival overgrowth: Old problem, new problem. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991; 2:103–137.
190. Seymour RA, Thomason JM, Ellis JS. The pathogenesis of druginduced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol.* 1996; 23:165–175.
191. Trackman PC, Kantarci A. Molecular and clinical aspects of druginduced gingival overgrowth. *J Dent Res.* 2015; 94:540–546.
192. Seymour RA, Ellis JS, Thomason JM. Risk factors for druginduced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol.* 2000; 27:217–223.
193. Esterberg HL, White PH. Sodium dilantin gingival hyperplasia. *J Am Dent*

- Assoc. 1945; 32:16–24.
194. Rateitschak-Pluss EM, Hefti A, Lortscher R, Thiel G. Initial observation that cyclosporin-A induces gingival enlargement in man. *J Clin Periodontol.* 1983; 10:237–246.
195. Hefti A, Eshenaur AE, Hassel TM, Stone C. Gingival overgrowth in cyclosporine A treated multiple sclerosis patients. *J Periodontol.* 1994; 65:744–749.
196. Beaumont J, Chesterman J, Kellett M, Durey K. Gingival overgrowth: Part 1: Aetiology and clinical diagnosis. *Br Dent J.* 2017; 222:85–91.
197. Aguilar Agullo MJ, Cañamas Sanchis MV, Ibáñez Cabanell P, Gil Loscos F. Importancia del uso de índices en la práctica periodontal diaria del higienista dental. *Periodoncia.* 2003; 13 (No 3) Fasc. 8:233-244.
198. Silness J, Løe H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand.* 1964; 22:112-135.
199. Woodall IR Dafoe BR, Young NS, Weed-Fonner L, Yankell SL. *Tratado de Higiene dental.* 3a Ed. Barcelona: Salvat, 1992.
200. Ramfjord SP. Indices for prevalence and incidence of periodontal disease. *J Periodontol.* 1959; 30:51-59.
201. Greene JC, Vermillion JR. The oral hygiene index: a method for classifying oral hygiene status. *J Am Dent Assoc.* 1960; 61:172-179.
202. Greene JC, Vermillion JR. The simplified oral index. *J Am Dent Assoc.* 1964; 68:7-13.
203. O’Leary TJ, Drake RB, Naylor JE. The plaque control record. *J Periodontol.*

- 1972; 43:38.
204. Lindhe J. Textbook of clinical periodontology. Copenhagen: Munksgaard, 1983.
205. Quigley G, Hein JW. Comparative cleansing efficiency of manual and power brushing. J Am Dent Assoc. 1962; 65:26-29.
206. Turesky S, Gilmore ND, Glickman I. Reduced plaque formation by the chloromethyl analogue of vitamine C. J Periodontol. 1970; 41:41-43.
207. Elliott JR, Bowers GM, Clemmer BA, Rovelstad GH. Evaluation of an oral physiotherapy center in the reduction of bacterial plaque and periodontal disease. J Periodontol. 1972; 43:221-224.
208. Martens LV, Meskin LH. An innovative technique for assessing oral hygiene. J Dent Child. 1972; 39:12-14.
209. Löe H. The gingival index, the plaque index, and the retention index systems. J Periodontol. 1967; 38: 610.
210. Carter HG, Barnes GP. The gingival bleeding index. J Periodontol. 1974; 45:11;801–805.
211. Craig D, Duhamel L. The papillary bleeding index: a new aspect in motivation. Eighth International Symposium on Dental Hygiene, Brighton, 1981.
212. Saxer UP, Turconi B, Elsasser CH. Patient motivation with the papillary bleeding index. J Prev Dent. 1977; 4:20-22.
213. Nightingale KJ, Chinta SK, Agarwal P, Nemelivsky M, Frisina AC, Cao Z, Norman RG, Fisch GS, Corby P. Toothbrush efficacy for plaque removal. Int J Dent Hyg. 2014 Nov;12(4):251-256.
214. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque.

- Int Dent J. 1975; 25:229-235.
215. Mühlemann, HR, Son S. Gingival sulcus bleeding a leading symptom in initial gingivitis. *Helvetica Odontol Acta*. 1971; 15:107-113.
216. Ainamo J, Barmes D, Beagrie G, Cutress T, Martin J, Sardo-Infirri J. Development of the World Health Organization (WHO) community periodontal index of treatment needs (CPITN). *Int Dent J*. 1982;32(3):281-291.
217. World Health Organization. Oral health surveys: basic Methods. 3a edition. Geneva: WHO, 1987.
218. Ainamo J, Ainamo A. Validity and relevance of the criteria of the CPITN. *Int Dent J*. 1994;44 (5 Suppl 1): 527-532.
219. World Health Organization. Oral health surveys: basic Methods. 4a edition. Geneva: WHO, 1997.
220. Periodontal screening and recording training program kit. Chicago: American Dental Association and American Academy of Periodontics, 1992.
221. Galván J, Andrés de Llano J, Blanco-Moreno J, Andura J. Sistemas simplificados de examen periodontal. Actualización. *Periodoncia* 2002; 12:7-18.
222. Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res*. 2003; 82:82–90.
223. Pozo P, Valenzuela MA, Melej C, Zaldívar M, Puente J, Martínez B, Gamonal J. Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Periodontal Res*. 2005; 40(3):199–207.

224. De Carlo AA Jr, Windsor LJ, Bodden MK, Harber GJ, Birkedal-Hansen B, Birkedal-Hansen H. Activation and novel processing of matrix metalloproteinases by a thiol-proteinase from the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res.* 1997; 76(6):1260–1270.
225. Fentoğlu Ö, Köroğlu BK, Hiçyılmaz H, Sert T, Özdem M, Sütçü R, Tamer MN, Orhan H, Ay ZY, Öztürk Tonguç M, Kırzioğlu FY. Pro-inflammatory cytokine levels in association between periodontal disease and hyperlipidaemia. *J Clin Periodontol.* 2011; Jan;38(1):8-16
226. Vernal R, Dezerega A, Dutzan N, Chaparro A, León R, Chandía S, Silva A, Gamonal J. RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. *Oral Dis.* 2006; May;12(3):283-289.
227. Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000. 2003; 31:77–104.
228. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9:248–266.
229. Hirano T., Akira S., Taga T. Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today.* 1990 Dec;11(12):443-449.
230. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol.* 1990; Nov 15;145(10):3297-3303.
231. Kobayashi T, Ishida K, Yoshie H. Increased expression of interleukin-6 (IL-6) gene transcript in relation to IL-6 promoter hypomethylation in gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2016 (69): 89–94.
232. Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue

- destruction. *J Periodontal Res.* 1993; 28:500–510.
233. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest.* 1989; 84:1045–1049.
234. Dongari-Bagtzoglou AI, Ebersole JL. Increased presence of interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secreting fibroblast subpopulations in adult periodontitis. *J Periodontol.* 1998; 69:899–910.
235. Dongari-Bagtzoglou AI, Ebersole JL. Production of inflammatory mediators and cytokines by human gingival fibroblasts following bacterial challenge. *J Periodont Res.* 1996; 31:90-98.
236. Goodson JM. Gingival crevice fluid flow. *Periodontol 2000.* 2003; 31:43-54.
237. Gemmel E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytoquines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 1997; 14:112-143.
238. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Characterization of celular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. *J Periodontal Res.* 2001;36(3) 194- 203.
239. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol.* 200;71 (10):1535-1545.
240. Chung RM, Crbic JT, Lamster IB. Interleukin-8 and beta-glucuronidase in gingival crevicular fluid. *J. Clin Periodontol.* 1997;24(3): 146-152.

241. Castro CE, Koss MA, López ME. Marcadores bioquímicos de la enfermedad periodontal. *Med Oral* 2003; 8:322-328.
242. Bruguera A. Sombras, un mundo de color. Vitoria, España: Ed. Puesta al día Publicaciones; 2002.
243. Clark EB. An analysis of tooth color. *J Am Dent Assoc.* 1931;18 (11):2093-2103.
244. Clark EB. Tooth color selection. *J Am Dent Assoc.* 1933;20(6):1065-1073.
245. Brewer JD, Wee A, Seghi R. Advances in color matching. *Dent Clin North Am.* 2004; 48:341–358.
246. Munsell AH. The Munsell book of color. Baltimore: Maryland; vol I, 1929; vol.II; 1943.
247. Dummett CO. Oral pigmentation. *J Periodontol.* 1960; 31: 356–360.
248. Takeda T, Ishigami K, Shimada A, Ohki K. A study of discoloration of the gingiva by artificial crowns. *Int J Prosthodont.*1996;9:197–202.
249. Gonzalo-Diaz DJ, Lindsey DT, Johnston W, Wee AG. Measurement of color for craniofacial structures using a 45/0-degree optical configuration. *J Prosthet Dent.* 2007; 97:45-53.
250. Culpepper WD. A comparative study of shade matching procedure. *J Prosthet Dent.* 1970; 24:166-73.
251. Terry DA. *Natural Aesthetics with Composite Resin.* Mahwah: Montage Media Corp; 2004.
252. Knispel G. Factors affecting the process of color matching restorative materials to natural teeth. *Quintessence Int.* 1991;22: 525-31.
253. Chu SJ. Use of a reflectance spectrophotometer in evaluating shade change

- resulting from tooth-whitening products. *J Esthet Restor Dent.* 2003; 15: S42-S48.
254. Seghi RR, Johnston WM, O'Brien J. Spectrophotometric analysis of color differences between porcelain systems. *J Prosthet Dent.* 1986; 56(1): 35-40
255. Lehmann KM, Devigus A, Igiel C, Wentaschek S, Azar MS, Scheller H. Repeatability of color measuring devices. *Eur J Esthet Dent.* 2011; 6:428-435.
256. Seghi RR, Hewlett ER, Kim J. Visual and instrument colorimetric assessments of small color differences on translucent dental porcelain. *J Dent Res.* 1989; 68:1760–1764.
257. Chu SJ. Precision shade technology contemporary strategies in shade selection. *Pract Proced Aesthet Dent.* 2002; 14(1):79-83.
258. Hassel AJ, Koke U, Schmitter M, Beck J, Rammelsberg. Clinical effect of different shade guide systems on the tooth shades of ceramic-veneered restorations. *Int J Prosthodont.* 2005; 18:422-426.
259. Boyd LD, Lampi KJ. Importance of nutrition for optimum health of the periodontium. *J Contemp Dent Pract.* 2001; 2: 36-45.
260. Leggott PJ, Robertson PB, Rothman DL, Murray PA, Jacob RA. The effect of controlled ascorbic acid depletion and supplementation on periodontal health. *J Periodontol.* 1986; 57: 480-485.
261. Leggott PJ, Robertson PB, Jacob RA, Zambon JJ, Walsh M, Armitage GC. Effects of ascorbic acid depletion and supplementation on periodontal health and subgingival microflora in humans. *J Dent Res.* 1991; 70: 1531-1536.
262. Neiva RF, Steigenga J, Al-Shammari KF, Wang HL. Effects of specific

- nutrients on periodontal disease onset, progression and treatment. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 579-580.
263. Gokhale NH, Acharya AB, Patil VS, Trivedi DJ, Thakur SL. A short-term evaluation of the relationship between plasma ascorbic Acid levels and periodontal disease in systemically healthy and type 2 diabetes mellitus subjects. *J Diet Suppl.* 2013 Jun; 10(2):93-104.
264. Lingström P, Fure S, Dinilzen B, Fritzne C, Klefbom C, Birkhed D. The release of vitamin C from chewing gum and its effects on supragingival calculus formation. *Eur J Oral Sci.* 2005; Feb;113(1):20-27.
265. Govindaraj J, Emmadi P, Deepalakshmi, Rajaram V, Prakash G, Puvanakrishnan R. Protective effect of proanthocyanidins on endotoxin induced experimental periodontitis in rats. *Indian J Exp Biol.* 2010; Feb;48(2):133-142.
266. Xu Z, Du P, Meiser P, Jacob C. Proanthocyanidins: oligomeric structures with unique biochemical properties and great therapeutic promise. *Nat Prod Commun.* 2012 Mar;7(3):381-388.
267. Nishida M, Grossi SG, Dunford RG, Ho A W, Trevisan M, Genco RJ. Dietary vitamin C and the risk for periodontal disease. *J Periodontol.* 2000 Aug;71(8):1215-1223.
268. Vaananen MK, Markkanen HA, Tuovinen VJ, Kullaa AM, Karinpaa AM, Kumpusalo EA. Periodontal health related to plasma ascorbic acid. *Proc Finn Dent Soc.* 1993;89(1-2):51-59.
269. Bonifait L, Grenier D. Cranberry polyphenols: potential benefits for dental caries and periodontal disease. *J Can Dent Assoc.* 2010;76-130.

270. Lin LZ, Sun J, Chen P, Monagas MJ, Harnly JM. UHPLC-PDA-ESI/HRMSn profiling method to identify and quantify oligomeric proanthocyanidins in plant products. *J Agric Food Chem.* 2014; Oct 1; 62(39): 9387–9400.
271. Absalon C, Fabre S, Tarascou I, Fouquet E, Pianet I. New strategies to study the chemical nature of wine oligomeric procyanidins. *Anal Bioanal Chem.* 2011; Sep;401(5):1485-1495.
272. Valencia-Avilés E, Ignacio-Figueroa I, Sosa-Martínez E, Bartolomé-Camacho MC, Martínez-Flores HE, García-Pérez ME. Polyphenols: antioxidant and toxicological properties. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas.* 2016; Oct; 16: 1390-1869.
273. Cos P, De Bruyne T, Hermans N, Apers S, Berghe DV, Vlietinck AJ. Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Curr Med Chem.* 2004; May;11(10):1345-1359.
274. Saito A. Challenges and complexity of functionality evaluation of flavan-3-ol derivatives. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2017 Jun;81(6):1055-1060.
275. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 2006; 99(1), 191–203.
276. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2013; May 10;18(14):1818-1892.
277. Zhang B, Cai J, Duan CQ, Reeves MJ, He F. A review of polyphenolics in oak Woods. *Int J Mol Sci.* 2015; Mar 27;16(4):6978-7014. Gonçalves J, Silva

- CL, Castilho PC, Câmara JS. An attractive, sensitive and high-throughput strategy based on microextraction by packed sorbent followed by UHPLC-PDA analysis for quantification of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in wines. *Microchem J.* 2013; 106:129-138.
278. Haminiuk CWI, Maciel GM, Plata-Oviedo MSV, Peralta RM. Phenolic compounds in fruits - an overview. *Int. J Food Sci Technol.* 2012; 47(10):2023-2044.
279. Leggott PJ, Roberlson PB, Jacob RA, Zambon JJ, Walsh M, Armitage GC. Effects of ascorbic acid depletion and supplementation on periodontal health and subgingival micro flora in humans. *J Dent Res.* 1991 Dec;70(12):1531-1536.
280. Holmes LG. Effects of smoking and/or vitamin C on sulcular fluid rate in clinically healthy gingiva. *Quintessenz.* 1990; Mar;41(3):465-471.
281. Meyle J, Kapitza K. Assay of ascorbic acid in human crevicular fluid from clinically healthy gingival sites by high-performance liquid chromatography. *Arch Oral Biol.* 1990;35(4):319-323.
282. Leggott PJ, Roberlson PB, Rothman DL, Munay PA, Jacob RA. The effect of controlled ascorbic acid depletion and supplementation on periodontal health. *J Periodontol.* 1986 Aug;57(8):480-485.
283. Govindaraj J, Emmadi P, Deepalakshmi, Rajaram V, Prakash G, Puvanakrishnan R. Protective effect of proanthocyanidins on endotoxin induced experimental periodontitis in rats. *Indian J Exp Biol.* 2010 Feb;48(2):133-142.
284. Varoni EM, Lodi G, Sarclella A, Carrassi A, Iriti M. Plant polyphenols and oral

- health: old phytochemicals for new fields. *Curr Med Chem.* 2012;19(11):1706-1720.
285. Scalbert, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry.* 1991; 30(12):3875-3883.
286. Kolodziej H, Kayser O, Latte, KP, Ferreira D. Recent Advances in Polyphenol Research. *Planta Med.* 1999; 65:444-446.
287. De Bruyne T, Pieters L, Dommissie R, Kolodziej H, Wray V, Vanden Berghe D, Vlietinck A. NMR characterization and biological evaluation of proanthocyanidins: a systematic approach. In *Plant Polyphenols 2.* 1999; 2:193-209.
288. Howell AB, Vorsa N, Der Marderosian A. Inhibition of the adherence of P-fimbriated *Escherichia coli* to uroepithelial-cell surfaces by proanthocyanidin extracts from cranberries. *N Engl J Med.* 1998 Nov 5;339(19):1408
289. Foo LY, Lu Y, Howell AB, Vorsa N. The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli* in vitro. *Phytochemistry.* 2000; May;54(2):173-181.
290. Lin HC, Lee SS. Proanthocyanidins from the Leaves of *Machilus philippinensis*. *J Nat Prod.* 2010 Aug 27;73(8):1375-1380.
291. Cos P, Berghe DV, Bruyne TD, Vlietinck AJ. Plant substances as antiviral agents: an update. *Curr Org Chem.* 2003; Aug 7(12): 1163-1180.
292. Douglas Kinghorn A. Pharmacognosy in the 21st century. *J Pharm Pharmacol.* 2001 Feb;53(2):135-148.
293. Vlietinck AJ, De Bruyne T, Apers S, Pieters LA. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV)

- infection. *Planta Med.* 1998; Mar;64(2):97-109.
294. De Clercq, E. Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Med Res Rev.* 2000 Sep;20(5):323-349.
295. Jung M, Lee S, Kim H. Recent studies on natural products as anti-HIV agents. *Curr Med Chem.* 2000; Jun;7(6):649-661.
296. Barnard DL, Smee DF, Huffman JH, Meyerson LR, Sidwell RW. Antiherpesvirus activity and mode of action of SP-303, a novel plant flavonoid. *Chemotherapy.* 1993 May-Jun;39(3):203-211.
297. Avelar TMT, Storch AS, Castro LA, Azevedo GVM, Ferraz L, Lopes PF. Oxidative stress in the pathophysiology of metabolic syndrome: which mechanisms are involved?. *J Bras Patol Med Lab.* 2015; Aug; 51(4):231-239.
298. Shay J, Elbaz HA, Lee I, Zielske SP, Malek MH, Hüttemann M. Molecular Mechanisms and Therapeutic Effects of (-)-Epicatechin and Other Polyphenols in Cancer, Inflammation, Diabetes, and Neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 2015: 1-13.
299. López-Alarcón C, Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta.* 2013; Feb 6;763:1-10.
300. Corrales LC, Muñoz-Ariza MM. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova.* 2012; 10(18):213– 225.
301. Auberval N, Dal S, Bietiger W, Seyfritz E, Peluso J, Muller C, Zhao M, Marchioni E, Pinget M, Jeandidier, Maillard E, Schini-Kerth V, Sigrist S.

- oxidative stress type influences the properties of antioxidants containing polyphenols in RINm5F Beta cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015; 2015:1–11.
302. Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors.* 1997;6(4):391-397.
303. Yokozawa T, Chen CP, Dong E, Tanaka T, Nonaka GI, Nishioka I. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochem Pharmacol.* 1998; Jul15;56(2):213-222.
304. Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M, Hara Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic Biol Med.* 1996;21(6):895-902.
305. Plumb GW, De Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Cheynier V, Williamson G. Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radic Res.* 1998 Oct;29(4):351-358.
306. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* New York: Oxford University Press; 1999.
307. Hurrell RF, Reddy M, Cook JD. Inhibition of nonhaem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. *Br J Nutr.* 1999; Apr;81(4):289-295.
308. Santos-Buelga C, Scalbert AJ. Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Sci. Food Agric.* 2000; 80(7):1094-1117.
309. Schewe T, Sadik C, Klotz LO, Yoshimoto T, Kühn H, Sies H. Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. *Biol Chem.* 2001;

- Dec;382(12):1687-1696.
310. Rayner NA., Parker DE, Horton EB, Folland CK, Alexander LV, Rowell DP, Kent EC, Kaplan A. Global analyses of sea surface temperature, sea ice, and night marine air temperature since the late nineteenth century. *J Geophys Res.* 2003; 108(D14): 4407.
311. Stevens JF, Miranda CL, Wolthers KR, Schimerlik M, Deinzer ML, Buhler DR. Identification and in vitro biological activities of hop proanthocyanidins: inhibition of nNOS activity and scavenging of reactive nitrogen species. *J Agric Food Chem.* 2002; Jun 5;50(12):3435-3443.
312. Hatano T, Miyatake H, Natsume M, Osakabe N, Takizawa T, Ito H, Yoshida T. Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects. *Phytochemistry.* 2002; Apr;59(7):749-758.
313. Arteel GE, Schroeder P, Sies H. Reactions of peroxynitrite with cocoa procyanidin oligomers. *J Nutr.* 2000; Aug;130(8S Suppl):2100S-2104S.
314. Deigner HP, Kinscherf R. Modulating apoptosis: current applications and prospects for future drug development. *Curr Med Chem.* 1999; May;6(5):399-414.
315. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2000; Aug;29(3-4):323-333.
316. Matés JM, Sánchez-Jiménez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000; Feb;32(2):157-170.
317. Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, Agarwal R, Mukhtar H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell

- cycle arrest in human carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst.* 1997; Dec 17;89(24):1881-1886.
318. Chen ZP, Schell JB, Ho CT, Chen KY. Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. *Cancer Lett.* 1998; Jul 17;129(2):173-179.
319. Ray SD, Kumar MA, Bagchi D. A novel proanthocyanidin IH636 grape seed extract increases in vivo Bcl-XL expression and prevents acetaminophen-induced programmed and unprogrammed cell death in mouse liver. *Arch Biochem Biophys.* 1999; Sep 1;369(1):42-58.
320. Reed J. Cranberry flavonoids, atherosclerosis and cardiovascular health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2002;42(3 Suppl):301-316.
321. Steinberg DJ. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem.* 1997; Aug 22;272(34):20963-20966.
322. Lacaille-Dubois, Franck U, Wagner H. Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. *Phytomedicine.* 2001; Jan;8(1):47-52.
323. Meunier MT, Villié F, Jonadet M, Bastide J, Bastide P. Inhibition of angiotensin I converting enzyme by flavanolic compounds: in vitro and in vivo studies. *Planta Med.* 1987 Feb;53(1):12-15.
324. Caballero-George C, Vanderheyden PM, De Bruyne T, Shahat AA, Van den Heuvel H, Solis PN, Gupta MP, Claeys M, Pieters L, Vauquelin G, Vlietinck AJ. In vitro inhibition of [3H]-angiotensin II binding on the human AT1 receptor by proanthocyanidins from *Guazuma ulmifolia* bark. *Planta Med.* 2002 Dec;68(12):1066-1071.

325. Rein D, Paglieroni TG, Wun T, Pearson DA, Schmitz HH, Gosselin R, Keen CL. Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am J Clin Nutr.* 2000 Jul;72(1):30-35.
326. Pearson DA, Paglieroni TG, Rein D, Wun T, Schramm DD, Wang JF, Holt RR, Gosselin R, Schmitz HH, Keen CL. The effects of flavanol-rich cocoa and aspirin on ex vivo platelet function. *Thromb Res.* 2002 May 15;106(4-5):191-197.
327. Holt RR, Schramm DD, Keen CL, Lazarus SA, Schmitz HH. Chocolate consumption and platelet function. *JAMA,* 2002, 287, 2212.
328. Schramm DD, Wang JF, Holt RR, Ensunsa JL, Gonsalves JL, Lazarus SA, Schmitz HH, German JB, Keen CL. Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr.* 2001 Jan;73(1):36-40.
329. Sato M, Bagchi D, Tosaki A, Das DK. Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia/reperfusion-induced activation of JNK-1 and C-JUN. *Free Radic Biol Med.* 2001; Sep 15;31(6):729-737.
330. Cui J, Cordis GA, Tosaki A, Maulik N, Das DK. Reduction of myocardial ischemia reperfusion injury with regular consumption of grapes. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; May;957:302-307.
331. Facino RM, Carini M, Aldini G, Berti F, Rossoni G, Bombardelli E, Morazzoni P. Diet enriched with procyanidins enhances antioxidant activity and reduces myocardial post-ischaemic damage in rats. *Life Sci.* 1999;64(8):627-642.
332. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis mechanisms. In: Schluger S,

- Youdelis R, Page RC, editors: Periodontal disease basic phenomena, clinical management and restorative interrelationships. Philadelphia: Lea&Febiger; 1977.
333. Adriano-Anaya MP, Caudillo-Joya T, Caudillo-Adriano PA. Edad de la Erupción Permanente en una Población Infantil de la Ciudad de México. *Int J Odontostomat*. 2015; Ago; 9(2): 255-262.
334. Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol 2000*. 1997; Feb;13:41-75.
335. Syndergaard B, Al-Sabbagh M, Kryscio RJ, Xi J, Ding X, Ebersole JL, Miller CS. Salivary biomarkers associated with gingivitis and response to therapy. *J Periodontol*. 2014 Aug;85(8):e295-303.
336. Morelli T, Stella M, Barrosetal SP. Salivary biomarkers in a biofilm overgrowth model. *J Periodontol*. 2014 Dec;85(12):1770-1778.
337. Boronat-Catalá M, Catalá-Pizarro M, Bagán JV. Salivary and crevicular fluid interleukins in gingivitis. *J Clin Exp Dent*. 2014; Apr 1;6(2):e175-179.
338. Mohana T, Navin AV, Jamuna S, Sakeena Sadullah MS, Niranjali Devaraj S. Inhibition of differentiation of monocyte to macrophages in atherosclerosis by oligomeric proanthocyanidins -In-vivo and in-vitro study. *Food Chem Toxicol*. 2015; May 14;82:96-105.
339. Wang Z, Su B, Fan S, Fei H, Zhao W. Protective effect of oligomeric proanthocyanidins against alcohol-induced liver steatosis and injury in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; Mar 20;458(4):757-762.
340. Löhr G, Beikler T, Podbielski A, Standar K, Redanz S, Hensel A. Polyphenols from *Myrothamnus flabellifolia* Welw. inhibit in vitro adhesion of

- Porphyromonas gingivalis and exert anti-inflammatory cytoprotective effects in KB cells. *J Clin Periodontol* 2011; 38: 457–469.
341. Schmuck J, Beckert S, Brandt S, Löhr G, Hermann F, Schmidt TJ, Beikler T, Hensel A. Extract from *Rumex acetosa* L. for prophylaxis of periodontitis: inhibition of bacterial in vitro adhesion and of gingipains of *Porphyromonas gingivalis* by epicatechin-3-O-(4 $\beta$ →8)-epicatechin-3-O-gallate (procyanidin-B2-Di-gallate). *PLoS One*. 2015; Mar 24;10(3):e0120130.
342. de Oliveira Caleare A, Hensel A, Mello JC, Pinha AB, Panizzon GP, Lechtenberg M, Petereit F, Nakamura CV. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Limonium brasiliense* inhibit the adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to epithelial host cells by interaction with gingipains. *Fitoterapia*. 2017 Apr;118:87-93.
343. Widén C, Renvert S, Persson GR. Antibacterial activity of berry juices, an in vitro study. *Acta Odontol Scand*. 2015;73(7):539-543.
344. Ben Lagha A, Dudonné S, Desjardins Y, Grenier D. Wild Blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) Polyphenols Target *Fusobacterium nucleatum* and the Host Inflammatory Response: Potential Innovative Molecules for Treating Periodontal Diseases. *J Agric Food Chem*. 2015 Aug 12;63(31):6999-7008.
345. Zdarilová A, Rajnochová Svobodová A, Chytilová K, Simánek V, Ulrichová J. Polyphenolic fraction of *Lonicera caerulea* L. fruits reduces oxidative stress and inflammatory markers induced by lipopolysaccharide in gingival fibroblasts. *Food Chem Toxicol*. 2010 Jun;48(6):1555-1561.
346. Khairnar MR, Karibasappa GN, Dodamani AS, Vishwakarma P, Naik RG,

Deshmukh MA. Comparative assessment of cranberry and chlorhexidine mouthwash on streptococcal colonization among dental students: A randomized parallel clinical trial. *Contemp Clin Dent*. 2015 Jan-Mar;6(1):35-39.



# ANEXOS

# ANEXOS

## Anexo 1. Certificado del Comité Ético.



A quien pueda interesar:

El Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Sevilla, habiendo examinado el Proyecto “Estudio piloto en la prevención de la gingivitis con complemento exocian cran 40S y vitamina C” presentado por D. Daniel Torres Lagares emite el siguiente informe,

El proyecto cumple los requisitos exigidos para experimentación en sujetos humanos y en animales, y se ajusta a las normativas vigentes en España y en la Unión Europea.

Sevilla, a 28 de junio de 2013.

EL PRESIDENTE DEL COMITE,

Fdo.: Prof. Dr. Fernando Rodríguez Fernández.

## Anexo 2. Declaración de Helsinki.

## **Declaración de Helsinki**

## DECLARACIÓN DE HELSINKI DE LA ASOCIACIÓN MÉDICA MUNDIAL

### *Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos.*

Adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial de Helsinki, Finlandia, Junio de 1964 y enmendada por la 29ª Asamblea Médica Mundial de Tokio, Japón, Octubre de 1975, la 35ª Asamblea Médica Mundial de Venecia, Italia, Octubre de 1983, la 41ª Asamblea Médica Mundial de Hong Kong, Septiembre de 1989, la 48ª Asamblea General de Somerset West, Sudáfrica, Octubre de 1996 y la 52ª Asamblea General de Edimburgo, Escocia, Octubre de 2000.

### A. INTRODUCCIÓN

La Asociación Médica Mundial ha promulgado la Declaración de Helsinki como una propuesta de principios éticos que sirvan para orientar a los médicos y a otras personas que realizan investigación médica en seres humanos. La investigación médica en seres humanos incluye la investigación del material humano o de información identificables.

El deber del médico es promover y velar por la salud de las personas. Los conocimientos y la conciencia del médico han de subordinarse al cumplimiento de ese deber.

La Declaración de Ginebra de la Asociación Médica Mundial vincula al médico con la fórmula "velar solícitamente y ante todo por la salud de mi paciente", y el Código Internacional de Ética Médica afirma que: "El médico debe actuar solamente en el interés del paciente al proporcionar atención médica que pueda tener el efecto de debilitar la condición mental y física del paciente".

El progreso de la medicina se basa en la investigación, la cual, en último término, tiene que recurrir muchas veces a la experimentación en seres humanos.

En investigación médica en seres humanos, la preocupación por el bienestar de los seres humanos debe tener siempre primacía sobre los intereses de la ciencia y de la sociedad.

El propósito principal de la investigación médica en seres humanos es mejorar los procedimientos preventivos, diagnósticos y terapéuticos, y también comprender la etiología y patogenia de las enfermedades. Incluso, los mejores métodos preventivos, diagnósticos y terapéuticos disponibles deben ponerse a prueba continuamente a través de la investigación para que sean eficaces, efectivos, accesibles y de calidad.

En la práctica de la medicina y de la investigación médica del presente, la mayoría de los procedimientos preventivos, diagnósticos y terapéuticos implican algunos riesgos y costos.

La investigación médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales. Algunas poblaciones sometidas a la investigación son vulnerables y necesitan protección especial. Se deben reconocer las necesidades particulares de los que tienen desventajas económicas y médicas. También se debe prestar atención especial a los que no pueden otorgar o rechazar el consentimiento por sí mismos, a los que pueden otorgar el consentimiento bajo presión, a

los que no se beneficiarán personalmente con la investigación y a los que tienen la investigación combinada con la atención médica.

Los investigadores deben conocer los requisitos éticos, legales y jurídicos para la investigación en seres humanos en sus propios países, al igual que los requisitos internacionales vigentes. No se debe permitir que un requisito ético, legal o jurídico disminuya o elimine cualquiera medida de protección para los seres humanos establecida en esta Declaración.

## **B. PRINCIPIOS BÁSICOS PARA TODA INVESTIGACIÓN MÉDICA**

En la investigación médica, es deber del médico proteger la vida, la salud, la intimidad y la dignidad del ser humano.

La investigación médica en seres humanos debe conformarse con los principios científicos generalmente aceptados, y debe apoyarse en un profundo conocimiento de la bibliografía científica, en otras fuentes de información pertinentes, así como en experimentos de laboratorio correctamente realizados y en animales, cuando sea oportuno.

Al investigar, hay que prestar atención adecuada a los factores que puedan perjudicar el medio ambiente. Se debe cuidar también del bienestar de los animales utilizados en los experimentos.

El proyecto y el método de todo procedimiento experimental en seres humanos debe formularse claramente en un protocolo experimental. Éste debe enviarse, para consideración, comentario, consejo, y cuando sea oportuno, aprobación, a un comité de evaluación ética especialmente designado, que debe ser independiente del investigador, del patrocinador o de cualquier otro tipo de influencia indebida. Se sobreentiende que ese comité independiente debe actuar en conformidad con las leyes y reglamentos vigentes en el país donde se realiza la investigación experimental. El comité tiene el derecho de controlar los ensayos en curso. El investigador tiene la obligación de proporcionar información del control al comité, en especial sobre todo incidente adverso grave. El investigador también debe presentar al comité, para que la revise, la información sobre financiamiento, patrocinadores, afiliaciones institucionales, otros posibles conflictos de interés e incentivos para las personas del estudio.

El protocolo de la investigación debe hacer referencia siempre a las consideraciones éticas que fueran del caso, y debe indicar que se han observado los principios enunciados en esta Declaración.

La investigación médica en seres humanos debe ser llevada a cabo sólo por personas científicamente calificadas y bajo la supervisión de un médico clínicamente competente. La responsabilidad de los seres humanos debe recaer siempre en una persona con capacitación médica, y nunca en los participantes en la investigación, aunque hayan otorgado su consentimiento.

Todo proyecto de investigación médica en seres humanos debe ser precedido de una cuidadosa comparación de los riesgos calculados con los beneficios previsibles para el individuo o para otros. Esto no impide la participación de voluntarios sanos en la investigación médica. El diseño de todos los estudios debe estar disponible para el público.

Los médicos deben abstenerse de participar en proyectos de investigación en seres humanos a menos que estén seguros de que los riesgos inherentes han sido adecuadamente evaluados y de que es posible hacerles frente de manera satisfactoria. Deben suspender el experimento en marcha si observan que los riesgos que implican son más importantes que los beneficios esperados o si existen pruebas concluyentes de resultados positivos o beneficiosos.

La investigación médica en seres humanos sólo debe realizarse cuando la importancia de su objetivo es mayor que el riesgo inherente y los costos para el individuo. Esto es especialmente importante cuando los seres humanos son voluntarios sanos.

La investigación médica sólo se justifica si existen posibilidades razonables de que la población, sobre la que la investigación se realiza, podrá beneficiarse de sus resultados.

Para tomar parte en un proyecto de investigación, los individuos deben ser participantes voluntarios e informados.

Siempre debe respetarse el derecho de los participantes en la investigación a proteger su integridad. Deben tomarse toda clase de precauciones para resguardar la intimidad de los individuos, la confidencialidad de la información del paciente y para reducir al mínimo las consecuencias de la investigación sobre su integridad física y mental y su personalidad.

En toda investigación en seres humanos, cada individuo potencial debe recibir información adecuada acerca de los objetivos, métodos, fuentes de financiamiento, posible conflictos de intereses, afiliaciones institucionales del investigador, beneficios calculados, riesgos previsibles e incomodidades derivadas del experimento. La persona debe ser informada del derecho de participar o no en la investigación y de retirar su consentimiento en cualquier momento, sin exponerse a represalias. Después de asegurarse de que el individuo ha comprendido la información, el médico debe obtener entonces, preferiblemente por escrito, el consentimiento informado y voluntario de la persona. Si el consentimiento no se puede obtener por escrito, el proceso para lograrlo debe ser documentado y atestado formalmente.

Al obtener el consentimiento informado para el proyecto de investigación, el médico debe poner especial cuidado cuando el individuo está vinculado con él por una relación de dependencia o si consiente bajo presión. En un caso así, el consentimiento informado debe ser obtenido por un médico bien informado que no participe en la investigación y que nada tenga que ver con aquella relación.

Cuando la persona sea legalmente incapaz, o inhábil física o mentalmente de otorgar consentimiento, o menor de edad, el investigador debe obtener el consentimiento informado del representante legal y de acuerdo con la ley vigente. Estos grupos no deben ser incluidos en la investigación a

menos que ésta sea necesaria para promover la salud de la población representada y esta investigación no pueda realizarse en personas legalmente capaces.

Si una persona considerada incompetente por la ley, como es el caso de un menor de edad, es capaz de dar su asentimiento a participar o no en la investigación, el investigador debe obtenerlo, además del consentimiento del representante legal.

La investigación en individuos de los que no se puede obtener consentimiento, incluso por representante o con anterioridad, se debe realizar sólo si la condición física/mental que impide obtener el consentimiento informado es una característica necesaria de la población investigada. Las razones específicas por las que se utilizan participantes en la investigación que no pueden otorgar su consentimiento informado deben ser estipuladas en el protocolo experimental que se presenta para consideración y aprobación del comité de evaluación. El protocolo debe establecer que el consentimiento para mantenerse en la investigación debe obtenerse a la brevedad posible del individuo o de un representante legal.

Tanto los autores como los editores tienen obligaciones éticas. Al publicar los resultados de su investigación, el investigador está obligado a mantener la exactitud de los datos y resultados. Se deben publicar tanto los resultados negativos como los positivos o de lo contrario deben estar a la disposición del público. En la publicación se debe citar la fuente de financiamiento, afiliaciones institucionales y cualquier posible conflicto de intereses. Los informes sobre investigaciones que no se ciñan a los principios descritos en esta Declaración no deben ser aceptados para su publicación.

### C. PRINCIPIOS APLICABLES CUANDO LA INVESTIGACIÓN MÉDICA SE COMBINA CON LA ATENCIÓN MÉDICA

El médico puede combinar la investigación médica con la atención médica, sólo en la medida en que tal investigación acredite un justificado valor potencial preventivo, diagnóstico o terapéutico. Cuando la investigación médica se combina con la atención médica, las normas adicionales se aplican para proteger a los sujetos que participan en la investigación.

Los posibles beneficios, riesgos, costos y eficacia de todo procedimiento nuevo deben ser evaluados mediante su comparación con los mejores métodos preventivos, diagnósticos y terapéuticos existentes. Ello no

excluye que pueda usarse un placebo, o ningún tratamiento, en estudios para los que no hay procedimientos preventivos, diagnósticos o terapéuticos probados.

Al final de la investigación, todos los sujetos que participan en el estudio deben tener la certeza de que contarán con los mejores métodos preventivos, diagnósticos y terapéuticos probados y existentes, identificados por el estudio.

El médico debe informar cabalmente al paciente los aspectos de la atención que tienen relación con la investigación. La negativa del paciente a participar en una investigación nunca debe perturbar la relación médico-paciente.

Cuando en la atención de un enfermo los métodos preventivos, diagnósticos o terapéuticos probados han resultado ineficaces o no existen, el médico, con el consentimiento informado del paciente, puede permitirse usar procedimientos preventivos, diagnósticos y terapéuticos nuevos o no comprobados, si, a su juicio, ello da alguna esperanza de salvar la vida, restituir la salud o aliviar el sufrimiento. Siempre que sea posible, tales medidas deben ser investigadas a fin de evaluar su seguridad y eficacia. En todos los casos, esa información nueva debe ser registrada y, cuando sea oportuno, publicada. Se deben seguir todas las otras normas pertinentes de esta Declaración.

Anexo 3. Certificado del seguro médico del estudio clínico.

## CERTIFICADO

La Compañía HDI HANNOVER INTERNACIONAL (ESPAÑA) Seguros y Reaseguros, S.A., con domicilio en Madrid, C/ Luchana 23,

## CERTIFICA:

Que esta Compañía de Seguros tiene contratada y en vigor una Póliza de Responsabilidad Civil, registrada con el número **130/002/001896**, cuyo Tomador del Seguro es **LABORATORIOS LACER, S.A** con domicilio social en C/ Sardenya, 350 • 08025 Barcelona

Que la citada Póliza garantiza, en sus términos, la Responsabilidad Civil Legal del Promotor derivada de la realización de la Investigación Biomédica con procedimientos Invasivos, iniciada durante el periodo de vigencia de la póliza.

A los efectos del presente seguro y según se establece en el artículo 18º de la Ley 14/2007 de 3 de Julio, queda amparada, además de la Responsabilidad Civil Legal del Tomador del Seguro en su calidad de promotor de la investigación biomédica, la del Investigador principal y sus colaboradores la del hospital o centro donde se realice la Investigación Biomédica, así como la del Titular del mismo.

<b>Título</b>	<b>Estudio Piloto en la prevención de la Gingivitis con Complemento Exocian Cran 40s y Vitamina C</b>
<b>Código de Protocolo</b>	<b>DMLPH-Gin 01/2013</b>
<b>Duración prevista:</b>	<b>21.10.2013-201.01.2014</b>
<b>Centro:</b>	<b>Hospital Universitario Facultad de Odontología de Sevilla</b>
<b>Investigador:</b>	<b>Dr. Daniel Torres Lagares</b>

Se amparan los siniestros ocurridos dentro del periodo de duración de la Investigación Biomédica con procedimientos invasivos o de los 24 meses siguientes a la finalización de la misma.

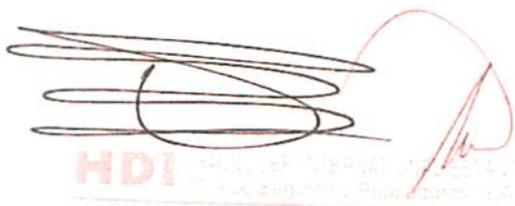
<b>Límite máximo asegurado por año</b>	<b>€ 3.000.000-</b>
<b>Sublímite por sujeto sometido a ensayo (aplicable sobre el sublímite anual):</b>	<b>€ 250.000-</b>
<b>Sublímite por daños materiales (aplicable sobre el sublímite anual)</b>	<b>€ 30.000-</b>

De acuerdo con lo establecido en el artículo 15 de la Ley de Contrato de Seguro 50/1980, la presente póliza no tendrá validez en el caso de que la prima no se encuentre al corriente de pago en la fecha de inicio del ensayo asegurado

Se extiende este Certificado a efectos informativos no confirmando al solicitante ningún derecho diferente al establecido en la póliza. Los derechos y obligaciones de las partes se encuentran regulados en los términos que se establece en la póliza y en los suplementos emitidos. Este Certificado no modifica, amplía ni extiende la cobertura acordada por las partes contratantes en la póliza mencionada

En caso de no ser aprobada la Investigación por los organismos competentes para ello, el presente Certificado carecerá de todo tipo de validez.

Y para que así conste, se emite el presente Certificado en Barcelona, a 16 de octubre de 2013.



**HDI** HANNOVER INTERNACIONAL (ESPAÑA) Seguros y Reaseguros, S.A.  
C/ Luchana 23, Madrid

## Anexo 4. Consentimiento informado.

## CONSENTIMIENTO ESCRITO

Título del estudio: **“Estudio Piloto en la Prevención de la Gingivitis con Complemento Exocian Cran 40s y Vitamina C”**

Yo \_\_\_\_\_

(Nombre y apellidos del paciente)

Habiendo entendido lo que mi odontólogo en este estudio me ha explicado y habiendo leído la hoja de información al paciente que se me ha entregado, estoy suficientemente informado y comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme cuando quiera del estudio, sin tener que dar ningún tipo de explicaciones y sin que esto repercuta en el trato y cuidados posteriores por parte de mi odontólogo.

Presto libremente mi consentimiento para participar en este estudio.

(Fecha) (Firma del paciente)

(Fecha) (Firma del investigador)

Anexo 5. Hoja de información para el paciente.

# **INFORMACIÓN AL PACIENTE**

## INFORMACION AL PACIENTE

Tal como su odontólogo le ha informado, la prevención de la gingivitis es primordial para evitar el desarrollo de enfermedades más graves como puede ser la periodontitis o enfermedad periodontal severa que en sus últimas fases puede cursar con pérdida de piezas dentales e incluso destrucción de hueso y problemas a distancia sobre otros órganos.

Una de las causas principales de la gingivitis es la formación de la denominada placa bacteriana constituida básicamente por microorganismos, restos de alimentos y todo ello se adhiere fuertemente al diente mediante una capa que crean las propias bacterias o microorganismos presentes en la boca.

Actualmente disponemos de medios para evitar y tratar la gingivitis, la mayoría se basa en un buen cepillado y uso de una pasta dental y un colutorio, todos ellos deberían utilizarse tres veces al día.

Le proponemos participar en un estudio para valorar un producto de origen natural a base de un extracto vegetal y una vitamina, indicado para la prevención de la gingivitis; este producto que es un complemento nutricional se toma por boca, una sola vez al día por la noche.

Los 20 sujetos de este estudio, incluido Usted, serán distribuidos al azar en dos grupos de tratamiento: un grupo utilizará el complemento alimenticio a estudio y el otro un comprimido similar, pero sin componentes activos. Ni Usted, ni su odontólogo conocerán qué tratamiento le ha correspondido antes de evaluar sus encías. Esto garantiza la total objetividad en la evaluación por parte del odontólogo así como una máxima fiabilidad de los resultados del estudio.

Si usted acepta participar en el estudio, tendrá que acudir a tres visitas: una al inicio del estudio y a los 15 y 21 días de haberlo iniciado.

Previo inicio de estudio se le realizara una limpieza de boca, se le entregara producto para usar a lo largo de los 21 días, así como un diario para anotar la toma de comprimidos y cualquier dato que Ud. juzgue relevante.

En las visitas a los 15 y 21 días, su odontólogo examinará su boca y le aplicara un colorante que detectara la presencia o no de placa bacteriana, no se realizara ninguna prueba cruenta, ni extracción de sangre, la única

medidas higiénicas orodentales durante todo el periodo de estudio. Las posibles complicaciones que la participación en el estudio pueden ocasionarle, es una inflamación gingival transitoria.

Su participación en el estudio tendrá una duración total de 21 días.

En la visita inicial se le entregará una hoja de información general en la que se le recuerdan las pautas básicas a seguir en el estudio (empleo correcto de la medicación, medicación concomitante,...), así como la medicación a utilizar (según el grupo correspondiente). Durante el estudio no deberá utilizar ninguna medicación oral o general diferente a los que se le hayan entregado y/o ya esté tomando en el momento de la inclusión en el estudio.

Debe saber que el interés que ponga en colaborar y seguir las instrucciones del odontólogo del estudio es fundamental para asegurar unos resultados científicamente válidos y útiles, de los que se podrán beneficiar muchas personas que tengan que utilizar el producto a estudio.

Su participación en el estudio es de carácter voluntario, pudiendo retirarse del mismo en cualquier momento que lo desee, sin tener que dar ninguna explicación de su abandono y sin perjuicio de trato y cuidados posteriores por parte del responsable del estudio. Si usted opta por retirarse, le rogamos que comunique al investigador las causas que le mueven a ello. Por otra parte, el investigador puede retirarle del estudio si lo creyese necesario.

Los datos recogidos de los 20 sujetos que participan en el estudio serán documentados de manera anónima. Tanto en los Cuadernos de Recogida de Datos como en la base de datos, los sujetos serán identificados por un número de sujeto, sus iniciales y sexo, en todo momento se cumplirá con la Ley Orgánica de Protección de datos (LOPD)

Ante cualquier duda o problema que se le presente, no dude en consultar con el investigador responsable de su estudio.

Agradecemos la colaboración prestada.

Anexo 6. Certificado de inocuidad del producto.



## Certificado de Inocuidad

El complemento alimenticio, comprimidos para chupar lotes H-1 y H-1-D, que Lacer entrega a la Facultad de Odontología (ubicada en C/. Avicena, s/n, de Sevilla) para realizar

### Estudio piloto en la prevención de la Gingivitis con Extracto de Cranberry y Vitamina C

(cod. Protocolo DMLPH-GIN01/2013)

es una formulación que:

- Cumple con la legislación para complementos alimenticios en Europa.
- En su composición se utilizan ingredientes y dosis empleados en complementos alimenticios.
- Han sido testados por personal Lacer, sin evidenciarse alteración alguna.
- Los comprimidos para chupar, lote H-1, contienen Proantocianidinas (PAC's) según Ph Eur, mayor a 36 mg/comprimido. Además de Ácido ascórbico (Vitamina C).
- Los comprimidos bucodispersables, H-1-D, no contienen activos.

Por todo lo expuesto, Lacer certifica que el producto complemento alimenticio utilizado para realizar el ensayo referido de **Estudio piloto en la prevención de la gingivitis con Extracto de Cranberry y Vitamina C**, son inocuos para la salud humana en sus condiciones normales de uso.

Los comprimidos entregados a la Facultad Odontología tiene la siguiente composición cualitativa.

*Ingredientes lote H-1:*

*Extracto de Cranberry, Ac. Ascórbico (Vitamina C), Xilitol, Manitol, Neohesperidina, Sacarina sódica, Vainillina, Aroma de Mora, Aerosil, Talco, Estearato de Magnesio Vegetal.*

*Ingredientes lote H-1-D:*

*Manitol, Neohesperidina, Sacarina sódica, Vainillina, Aroma de Mora, Aerosil, Talco, Estearato de Magnesio Vegetal, Colorante Carmín y Laca Aluminio Indigo Carmín..*

Barcelona, 03 de Septiembre de 2013  
LACER, S.A

Marta de Pablo  
Desarrollo de Producto Farmacéutico

## Anexo 7. Informe de calidad del producto.

# ELADIET®

vivir naturalmente

Elaborados Dietéticos, S.A.  
 c/Ponent, 10 Polig. Ind. "Can Mascaró" Nave 5  
 08756 La Palma de Cervelló - Barcelona (Spain)  
 http://www.eladiet.com  
 Teléfono: (+34) 93 672 06 69 - Fax: (+34) 93 672 01 04  
 e-mail: etadlet@eladiet.com



Especialidad:	LACER-PLACEBO	Código nº (Navision):	--
Forma farmacéutica	Comprimidos	Lote nº:	H-1-D
Método nº:	MP-OP-10		

### CONTROL CALIDAD PRODUCTO ACABADO

DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN	RESULTADOS	CUMPLE ESPECIFICACIÓN
Aspecto y color	Comprimido plano circular de 16 mm. Color púrpura moteado	cumple	Sí
Masa media	1500 mg ± 5% (1425-1575 mg)	1520,2 mg	Sí
Disgregación		25 min	
Dureza	Aprox. 150 N	180 N	Sí
Friabilidad		0,87 %	
Determinación de agua (KF)	< 5,0%	0,8%	Sí
Identificación Exocyan (TLC)	Banda característica a Rf	No se detecta	Sí
Identificación Ac. Ascórbico (HPLC)	Cromatograma patrón	No se detecta	Sí
Determinación Ac. Ascórbico (HPLC)	88 mg/comp. (20%.+50%) (70-132,6 mg/comp)	Inapreciable	Sí
PACs (PhEur Euracran)	> 36,0 mg/comp	NP	Sí
Aerobios totales (Herbal)	<10000 ufc/g	< 10 ufc/g	Sí
Hongos totales (Herbal)	< 100 ufc/g	< 10 ufc/g	Sí
Enterobacteriaceas (Herbal)	< 100 ufc/g	< 10 ufc/g	Sí
E.coli	Ausencia en 1 g	Ausencia en 1 g	Sí
Salmonella spp. (Herbal)	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g	Sí

Control de Calidad

31.07.2013	
Fecha	Firma

ELABORADOS DIETETICOS, S.A.  
 C/. Ponent, 10 Polig. Ind. "Can Mascaró" Nave 5  
 Tel. (93) 672 06 69 - Fax (93) 672 01 04  
 08756 LA PALMA DE CERVELLÓ  
 (Barcelona) ESPAÑA



Anexo 8. Cuaderno de recogida de datos del paciente.

## CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS (CRD)

### Código de protocolo DMLPH-Gin 01/2013

## INSTRUCCIONES PARA RELLENAR EL CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS

### INSTRUCCIONES GENERALES

1. Utilice un bolígrafo de color negro.
  2. Rellene con letra legible todos los datos del Cuaderno de Recogida de Datos (CRD).
  3. Verifique cada página del cuaderno una vez esté rellena.
  4. Firme cada página del cuaderno en que se le requiera.
  5. Rellene al menos una casilla para cada variable; si no le es posible precisar una respuesta:
    - Escriba ND (No Data) cuando no se haya realizado.
    - Escriba NA (No Aplicable) cuando no sea aplicable.
  6. Marque con una cruz las casillas adecuadas.
- Ejemplo:    SI        No
7. Complete todas las fechas con el día, mes y año en el orden que se indica en el CRD.

### CORRECCIONES Y ERRORES

1. No utilice nunca líquido corrector.
2. Trace una única línea a través de la información incorrecta y anote al lado el dato correcto.
3. Ponga sus iniciales, motivo (E = error), fecha y su firma en cada corrección:

Ejemplo:

Edad:        32    ABP    20-11-13    E

Si tiene cualquier duda respecto a un apartado del CRD, por favor, consulte al responsable del seguimiento del estudio, llamando al teléfono 93 446 53 73

**ESTUDIO PILOTO EN LA PREVENCIÓN DE LA GINGIVITIS CON COMPLEMENTO EXOCIAN CRAN 40S Y VITAMINA C**

CÓDIGO PACIENTE	<input type="checkbox"/>				
INICIALES PACIENTE	<input type="checkbox"/>				
	Nombre	Primer apellido	Segundo apellido		





**EXPLORACIÓN FÍSICA**

	Normal	Especificar	¿Cinteamiento relevante?
Ojos	<input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Sí ↓		<input type="checkbox"/> Sí <input checked="" type="checkbox"/> No
Oído, nariz y garganta	<input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Sí ↓		<input type="checkbox"/> Sí <input checked="" type="checkbox"/> No
Cardiovascular	<input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Sí ↓		<input type="checkbox"/> Sí <input checked="" type="checkbox"/> No
Respiratorio	<input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Sí ↓		<input type="checkbox"/> Sí <input checked="" type="checkbox"/> No
Digestivo	<input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Sí ↓		<input type="checkbox"/> Sí <input checked="" type="checkbox"/> No
Genito-urinario	<input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Sí ↓		<input type="checkbox"/> Sí <input checked="" type="checkbox"/> No
Piel y mucosas	<input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Sí ↓		<input type="checkbox"/> Sí <input checked="" type="checkbox"/> No
Músculo-esquelético	<input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Sí ↓		<input type="checkbox"/> Sí <input checked="" type="checkbox"/> No
Neurológico	<input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Sí ↓		<input type="checkbox"/> Sí <input checked="" type="checkbox"/> No
Sistema linfático	<input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Sí ↓		<input type="checkbox"/> Sí <input checked="" type="checkbox"/> No
Otros	<input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Sí ↓		<input type="checkbox"/> Sí <input checked="" type="checkbox"/> No
Ninguna	<input type="checkbox"/>		

**EXPLORACIÓN CAVIDAD ORAL**

- Presencia de Dientes de Ramfjord (16, 21, 24, 36, 41, 44)
- Ausencia de Dientes de Ramfjord (16, 21, 24, 36, 41, 44)

**Estado de las estructuras orales tejido peri-coronario**

- Normal
- Alterado \*

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

(\*): En el caso de resultado alterado, especificar en el apartado de alteraciones.



4: La placa cubre un tercio pero no más de dos tercias parte de la corona.  
 5: La placa cubre dos tercios o más de la corona

	16	21	24	36	41	44
Turesky						

Promedio Total

3. Índice de sangrado Gingival (0-3)

	16	21	24	36	41	44
Sangrado						

4. Líquido Crevicular

	16	21	24	36	41	44
IL-6						

Medicación concomitante

¿Desde la última visita, ha iniciado o cambiado su medicación?

SI \_\_\_\_\_  
 NO \_\_\_\_\_

En caso afirmativo, rellene el formulario de Medicación Concomitante

Acontecimientos Adversos

¿Desde la última visita, ha padecido algún Acontecimiento Adverso?

SI \_\_\_\_\_  
 NO \_\_\_\_\_

En caso afirmativo, rellene el formulario de Recogida de Acontecimientos Adversos

No olvide revisar el Diario del Paciente

Acuda a visita para la visita 3 el próximo

día mes año



SI \_\_\_\_\_  
 No

**En caso afirmativo, rellene el formulario de Recogida de Acontecimientos Adversos**

¿Ha recogido la medicación sobrante?

SI    ¿Cuántos comprimidos sobrantes se entregan?   
 No

**No olvide revisar y recoger el Diario del Paciente**

## Anexo 9. Acontecimientos adversos.

## **ANEXO 9. ACONTECIMIENTOS ADVERSOS.**

### **1. Abreviaturas**

AA = Acontecimiento Adverso.

AAG = Acontecimiento Adverso Grave.

AAGI = Acontecimiento Adverso Grave e Inesperado.

AAI = Acontecimiento Adverso Inesperado.

CIOMS = Council for International Organizations of Medical Sciences.

CRD = Cuaderno de Recogida de Datos.

FT = Ficha Técnica (Ver IBP).

IBP o RCP o FT = Información Básica del Producto o Resumen de las Características del Producto o Ficha Técnica.

IBSP = Información Básica de la Seguridad del Producto.

OIC = Organización que Investiga por Contrato.

RA = Reacción Adversa.

RAG = Reacción Adversa Grave.

RAI= Reacción Adversa Inesperada.

MI = Manual del Investigador.

RCP = Resumen de Características del Producto (Ver IBP).

RSM = Responsable de Seguridad de Medicamentos.

### **2. Definiciones (según ICH Topic E 2A 1995)**

#### **2.1. Acontecimiento adverso**

Cualquier suceso médico adverso que pueda presentar un paciente o sujeto de investigación clínica al que se ha administrado un producto farmacéutico y que no tiene necesariamente que tener una relación causal

con dicho tratamiento.

Por lo tanto, un AA puede ser cualquier signo (incluyendo, por ejemplo, un hallazgo anormal de laboratorio), síntoma o enfermedad no intencionados y desfavorables, asociados cronológicamente con la utilización de un producto farmacéutico, se considere o no relacionado con él.

## **2.2. Acontecimiento Adverso Grave**

Es aquel suceso médico etiquetado como tal que, independientemente de la dosis:

- Produce la muerte
- Pone en peligro la vida
- Precisa de ingreso hospitalario o lo prolonga
- Produce una discapacidad/incapacidad persistente o importante, o es una anomalía congénita

En otras situaciones, como en acontecimientos médicos importantes que no pongan en peligro inmediato la vida ni produzcan la muerte, pero que comprometan al sujeto o requieran intervención para prevenir alguno de los resultados enumerados en la definición anterior, debe utilizarse el juicio médico y científico para decidir si la comunicación expeditiva es adecuada. Estas situaciones, habitualmente, también se considerarán graves.

## **2.3. Reacción adversa**

Durante la fase previa a la autorización de una especialidad farmacéutica o de una nueva forma de uso, especialmente cuando las dosis terapéuticas

aún no se han establecido: "deben considerarse reacciones adversas a medicamentos todas las respuestas nocivas y no intencionadas a un medicamento con independencia de la dosis utilizada".

### **2.3.1. Reacción adversa inesperada**

Es aquella cuya naturaleza e intensidad no coincide con la información disponible del producto ("Manual del Investigador" si se trata de un producto en investigación no autorizado).

### **2.3.2. Otros - Parámetros de laboratorio**

Toda variación importante de los parámetros de laboratorio también puede representar un acontecimiento adverso si tiene importancia clínica o si, durante el tratamiento con el fármaco o especialidad farmacéutica en investigación, se observa una desviación de un parámetro, de un valor normal a otro patológico o un empeoramiento de un valor ya patológico. Al evaluar tales cambios, hay que tener en cuenta el grado de desviación respecto de los límites de la normalidad, la duración hasta el regreso a los límites de la normalidad una vez finalizado el tratamiento con el producto en investigación y el grado de variación del parámetro respectivo dentro de sus límites normales.

Si al final de la fase de tratamiento existiesen valores patológicos que no estaban presentes anteriormente, deben efectuarse nuevas investigaciones clínicas o de laboratorio hasta que los valores regresen a los límites de la normalidad o hasta que se encuentre una explicación plausible (p. ej., una enfermedad concomitante) para el parámetro de laboratorio

patológico.

Basándose en los criterios anteriores y en el estado clínico del sujeto, el investigador decidió en cada caso si un cambio de un parámetro de laboratorio tiene importancia y, por consiguiente, constituye un AA. Los cambios de los parámetros de laboratorio con un valor basal dentro de los límites normales a un valor definido previamente como patológico siempre deben considerarse AA.

### **3. Documentación y clasificación de acontecimientos adversos**

#### **3.1. Documentación**

En todas las visitas se preguntó al sujeto por los AA experimentados desde la visita anterior. Para recoger una información normalizada de los posibles AA, hubo que formular al sujeto en cada visita la pregunta siguiente:

“¿Le ha producido el fármaco alguna molestia?”

“¿Ha observado algún nuevo síntoma, molestia o lesión desde su última visita?”

Y, si procediese en razón de los objetivos de seguridad del estudio, se interrogó al sujeto para rellenar un impreso de AA o RA específico. Todos los AA o las RA que se produjesen durante el estudio debieron documentarse en las páginas respectivas del CRD. Para cada AA o RA deben documentarse los siguientes datos:

- Descripción del síntoma/acontecimiento.
- Intensidad.
- Fecha (hora) de la primera y la última aparición.
- Clasificación como “grave” o “no grave”

- Frecuencia (una vez, ocasionalmente, frecuentemente, permanentemente).
- Tratamiento requerido: no requiere tratamiento, tratamiento con fármacos de prescripción exclusivamente, tratamiento en régimen ambulatorio (con registro de las fechas), prolongación de la hospitalización (con registro de las fechas).
- Relación causal con el o los productos en investigación
- Medidas adoptadas con respecto a los productos en investigación (continuación de la medicación, suspensión temporal de la medicación, suspensión definitiva de la medicación).

### **3.2. Clasificación y codificación de la relación causal**

El investigador debe:

- Evaluar la intensidad y la gravedad del AA o RA
- Estimar la relación causal del AA o la RA con los fármacos utilizados en el estudio cuando sea grave, y registrar las medidas adoptadas para tratar el AA o la RA.

#### **3.2.1. Definición de causalidad**

La relación causal de un acontecimiento adverso con el o los productos en investigación se clasificó como sigue:

**Definitivo** - Evento clínico, incluyendo alteraciones de las pruebas de laboratorio, con relación temporal plausible respecto a la administración del

producto y que no puede ser explicado por una enfermedad concomitante u otros medicamentos o productos químicos. La respuesta a la retirada del producto es clínicamente plausible.

**Probable** - Evento clínico, incluyendo alteraciones de las pruebas de laboratorio, con relación temporal razonable respecto a la administración del producto, poco probable de ser explicada por una enfermedad concomitante u otros medicamentos o productos químicos y la respuesta a la retirada del producto es clínicamente plausible. No es necesaria la readministración del producto para cumplir con esta definición.

**Posible** - Evento clínico, incluyendo alteraciones de las pruebas de laboratorio, con relación temporal razonable respecto a la administración del producto, pero puede ser explicada por una enfermedad concomitante u otros medicamentos o productos químicos. Se desconoce el resultado de la retirada del producto o bien la información no es clara.

**Poco probable** - Evento clínico, incluyendo alteraciones de las pruebas de laboratorio, donde la relación temporal respecto a la administración del producto sugiere una relación causal improbable y donde otros medicamentos, productos químicos o enfermedades subyacentes proporcionan explicaciones plausibles.

**Condicional** - Evento clínico, incluyendo alteraciones de las pruebas de laboratorio, recogido como acontecimiento adverso, para el que es esencial más información para una apropiada evaluación o se está analizando información adicional.

**No valorable** - Informe que sugiere un acontecimiento adverso que no puede ser valorado porque la información es insuficiente o contradictoria y la

misma no puede ser complementada o verificada.

### **3.2.2. Definición y valoración de la intensidad**

La intensidad de los acontecimientos adversos se valoró de acuerdo con las siguientes categorías y definiciones:

- **Leve:** Existe un síntoma, pero se tolera (es un síntoma fácilmente tolerado).
- **Moderada:** Afecta a la actividad normal (cuando existen molestias suficientes para afectar a las actividades de la vida diaria del sujeto).
- **Intensa:** Efecto intenso/incapacidad para trabajar o realizar las actividades habituales. Es necesario suspender la medicación del ensayo.

## **3.3. Procedimientos de notificación**

### **3.3.1. Notificación**

Si el investigador llegó a la conclusión que se ha producido un AA o una RA, tuvo que notificarlos a la persona responsable del seguimiento del estudio en la siguiente visita de seguimiento o, en caso de AAG o RAG, inmediatamente (en un plazo de 24 horas) a la persona responsable del seguimiento del estudio y al Responsable de Seguridad de Medicamentos de LACER, S.A.

La información debió incluir al menos los siguientes datos:

- Nombre, dirección y número de teléfono del investigador que

realiza la notificación.

- Producto o productos en investigación.
- Código del estudio.
- Número, iniciales, sexo y fecha de nacimiento del sujeto.
- Descripción del AA o RA, medidas adoptadas y resultado.
- Clasificación preliminar del grado de intensidad, gravedad, de la relación causal, realizadas por el investigador.

Esta información pudo comunicarse por teléfono, fax, correo electrónico u otros medios. Si en ese momento aún no se conocía el resultado del acontecimiento o no pudo evaluarse la causalidad, no se cumplimentó las secciones para introducción de los datos hasta que se aclarasen. La persona responsable del seguimiento obtuvo lo antes posible la información que faltase, en colaboración con el investigador del estudio. La persona responsable del seguimiento debió asegurarse de que el investigador rellenase totalmente el impreso de notificación de AA.

### **3.3.2. Acontecimientos adversos graves (AAG)**

Todos los AAG debieron ser notificados, existiese o no una relación causal con el fármaco evaluado. Para garantizar la recogida de la información suficiente de todos los AA o RA detectados durante el ensayo clínico, se registró debidamente en el CRD de cada sujeto.

Todo AAG por cualquier causa que se produjese en el transcurso del estudio, esté o no relacionado con el producto en investigación, tuvo que notificarse inmediatamente (en un plazo de 24 horas) por teléfono, fax, correo

electrónico u otros medios a la persona responsable del seguimiento del estudio o al RSM de LACER, S.A.

### **3.3.3. Notificación general**

Todos los AA o RA, ya sean graves, inesperados o no graves, y los que se considerasen no relacionados con los tratamientos del estudio, fueron incluidos en forma de tabla en los informes periódicos de seguimiento y al final del estudio clínico.

La persona responsable del seguimiento fue responsable de obtener la máxima cantidad de información posible por escrito, visitando el centro hospitalario si fuese necesario para verificar los datos con el investigador del estudio.

Se estableció que todos los AA o RA relacionados con hallazgos anormales en la exploración física o en las evaluaciones de laboratorio o paraclínicas (radiografías, electrocardiogramas, etc.) fueran reevaluados a las 2 a 4 semanas del final del estudio o de la retirada del sujeto, y durante todo el tiempo que se considerase médicamente recomendable. Si se produjese cualquier acontecimiento adverso, el investigador iniciaría de inmediato las medidas terapéuticas y las investigaciones apropiadas.

Se determinó que, si fuese necesario retirar al sujeto del tratamiento debido a un AA, deberían practicarse las pruebas clínicas y analíticas apropiadas hasta que los valores aberrantes regresasen a niveles aceptables, o hasta que el investigador determinase que un valor aberrante no se debía al fármaco ni al procedimiento experimental, o hasta que se determinase la causa de la anomalía. El investigador debería registrar todos

esos hallazgos en las páginas correspondientes del CRD.

Los acontecimientos adversos y las enfermedades intercurrentes aparecidas durante el estudio debían tratarse con las medidas de asistencia habituales. Si dichas medidas constituyesen una desviación importante del protocolo, el sujeto sería retirado del estudio.

#### **4. Procedimientos en caso de urgencia**

El equipo investigador fue responsable de la disponibilidad de los medios y el personal especializado necesarios para afrontar las situaciones de urgencia que pudiesen producirse durante el estudio. Todos los sujetos recibieron instrucciones sobre la forma de ponerse en contacto con el personal médico relacionado con el estudio en caso necesario.

Si el sujeto tuviese que acudir a urgencias, mostraría su hoja de información sobre el estudio al médico de guardia, y se informaría al personal relacionado con el estudio. Si el sujeto quedase ingresado, se debía informar a la persona responsable del seguimiento y al responsable de LACER, S.A.

Todas las situaciones de urgencia debían ser registradas en el CRD. Sólo podría abrirse el código de aleatorización en urgencias cuando fuese necesario para conocer el tratamiento asignado a fin de poder administrar el tratamiento adecuado al sujeto. Si se abriese el código de aleatorización, debían indicarse los motivos, y el investigador o uno de sus colaboradores firmaría y fecharía el sobre. En este caso, se debería establecer contacto con la persona responsable del seguimiento y el responsable de LACER, S.A. lo antes posible.

Anexo 10. Artículo publicado en la revista *Mediators of inflammation* con factor de impacto 3.549 según los datos obtenidos del *Journal Citation Reports (JCR)* en el año 2017, según *Clarivate Analytics* en 2018.

Díaz Sánchez RM, Castillo-Dalí G, Fernández-Olavarría A, Mosquera-Pérez R, Delgado-Muñoz JM, Gutiérrez-Pérez JL, Torres-Lagares D. *A Prospective, Double-Blind, Randomized, Controlled Clinical Trial in the Gingivitis Prevention with an Oligomeric Proanthocyanidin Nutritional Supplement*. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:7460780.

## Clinical Study

# A Prospective, Double-Blind, Randomized, Controlled Clinical Trial in the Gingivitis Prevention with an Oligomeric Proanthocyanidin Nutritional Supplement

R. M. Díaz Sánchez, G. Castillo-Dalí, A. Fernández-Olavarria, R. Mosquera-Pérez, J. M. Delgado-Muñoz, J. L. Gutiérrez-Pérez, and D. Torres-Lagares

Oral Surgery Department, Dental School, University of Seville, Seville, Spain

Correspondence should be addressed to D. Torres-Lagares; [danieltl@us.es](mailto:danieltl@us.es)

Received 20 March 2017; Revised 10 August 2017; Accepted 13 September 2017; Published 10 December 2017

Academic Editor: Giuseppe Valacchi

Copyright © 2017 R. M. Díaz Sánchez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Aim.** To evaluate the effectiveness on tissue response of the new nutritional supplement made of oligomeric proanthocyanidins in induced gingivitis after 21 days of use. **Material and Methods.** A prospective, double-blind, randomized, controlled clinical trial was carried out on 20 patients; it is divided into an experimental group and a control group after fulfilling the selection criteria. Patients had to come 4 times during the study to register the Silness and Loe index, the gingival bleeding index, the plaque index, the inflammatory crevicular fluid study (IL6), and the changes in the brightness of the gingiva. No complementary hygiene methods were allowed during the 21 days. **Results.** The Silness and Loe index was higher in the control group than in the experimental group, reaching a twofold difference between the groups ( $p < 0.0001$ ). The gingival bleeding index also supports this fact, since the bleeding was lower in the experimental group ( $p < 0.005$ ). However, the dental plaque on the tooth surface according to the plaque index was 33% higher in the experimental group ( $p < 0.006$ ). Some differences in the IL-6 were found in the crevicular fluid ( $p < 0.0001$ ). **Conclusion.** Oligomeric proanthocyanidins have an effect on the periodontal tissue's health. No effects on the accumulation of plaque on the tooth surface were found, so further studies are needed to determine the nature of the plaque.

## 1. Introduction

Gingivitis is an inflammatory disease of dental tissue support that in the first instance affects the gingiva. Gingivitis could move on to more advanced stages, leading to the development of periodontitis, in which the inflammation and bacterial infection can produce the destruction of the supporting tissues of the teeth, gingiva, periodontal ligament, and alveolar bone [1–5].

Gingivitis is due to the long-term effects of plaque deposits on the teeth, which is composed of bacteria, located on the surfaces of the teeth and in the gingival sulcus. If plaque is not prevented or removed, it turns into a hard deposit called tartar (or calculus) that becomes trapped at the base of the tooth. Plaque and calculus irritate and produce gingival swelling. Bacteria and the toxins produce infection and more swelling gingiva [1–5].

Crevicular fluid is normal plasma exuded flowing through the gingival sulcus. A patient with gingivitis develops an inflammatory response with a large number of mediators involved, such as the cytokines IL-6 and IL-8 [1–6].

Interleukin 6 (IL-6) is a multifunctional cytokine that is produced by a range of cells, and it is involved in the B-cell differentiation, proliferation, and differentiation of T cells; in the immunoglobulin, stimulation by the B-cell secretion [7] can also induce bone reabsorption [8]. IL6 is a useful diagnostic indicator to determine the progression of the gingivitis to a periodontal disease [9].

The treatment goal of gingivitis is to reduce inflammation by cleaning the teeth, using different instruments to remove the dental plaque deposits according to the case [6]. It is important to educate the patient and prescribe special toothpaste, mouthwash, gel, and so forth which contain a wide spectrum of antiseptic and anti-inflammatory properties.

However, the dentist has the responsibility to explain the correct tooth brushing technique to achieve good results [2, 3].

The oligomeric proanthocyanidins (OPCs) are one of the most abundant polyphenolic substances in the plant kingdom. These substances exhibit a range of rather surprising physical and chemical properties which, once applied to living organisms, are translated into a multitude of biological activities [10]. The OPCs have been recently investigated, and, apart from its powerful antioxidant activity, they have been shown to have anticancer, anti-inflammatory, antimicrobial, and vasodilatory properties, revealing to be a potentially valuable therapeutic tool for the treatment of many illnesses [11–15].

The available research has demonstrated that the acidic environment of the human stomach does not easily degrade the proanthocyanidins; therefore, the rates of absorption in the upper gastrointestinal tract are not high [16].

However, it seems that even the low levels observed in urine after an oral dose (generally less than 250/0 of doses/original) are sufficient to significantly increase the antioxidant capacity in plasma/serum. When OPCs reach the colon, they suffer an extensive degradation due to colonic flora [16].

The metabolites and biological properties of this process have not been investigated yet; it has been suggested that they may have protective effects on the antioxidant and systemic illness [11–16].

Regarding the other component included in the OPCs, vitamin C, we know that it is a good associative option to bilberry. Vitamin C generally provides properties that contribute to the formation of collagen, which helps to maintain functionality of teeth and gums and other properties such as reinforcement of the immune system and potent antioxidant opposition to oxidative stress [17–21].

Although *in vitro* studies published about the interaction between the OPCs and pathogens in the oral cavity have had very good results, there are no publications with the appropriate design to assess the clinical efficacy of OPCs in gingival disease in human, except an article published in 2015 comparing the chlorhexidine and the cranberry mouthwash [22–25].

The aim of this study is to evaluate the effectiveness of the new nutritional supplement made of oligomeric proanthocyanidins (OPCs) on tissue response to prevent gingivitis. We hypothesise a healthy state of the periodontal tissue in the study group versus gingivitis in the control group.

## 2. Material and Methods

**2.1. Study Design and Population.** A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial of 21 days of duration was conducted among 20 volunteer students of the School of Dentistry of the University of Seville. The duration of 21 days was chosen as that time allows the parameter study on the gingiva and was enough to study the inflammation of the gingiva without causing any irreversible problem in it. No previous studies have been found in the literature, so 20 subjects were determined for the pilot study to test our hypothesis.

The Ethics Committee of the University of Seville approved the study protocol. Prior to participation, the

purpose and procedures were fully explained to all healthy volunteers and all participants gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The study was designed, conducted, analyzed, and reported according to the guidelines for Good Clinical Practice. The study was approved by the <http://ClinicalTrials.gov> Protocol Registration and Results System with the number NCT02515929. The protocol can be accessed if necessary in <http://ClinicalTrials.gov>.

The study was carried out between September 2013 and January 2014. The recruitment started in September, and the baseline stage took place in October 2013. After the 21-day follow-up data was treated obtaining the results in January 2014.

The medical and dental histories were done at the pre-screening visit, and we selected the 21 participants based on the inclusion and exclusion criteria. The inclusion criteria were the following: subjects older than 18 years old, male or female, good overall health, and a minimum of 20 teeth (teeth with big caries were crowned or extensively restored, and teeth that were orthodontic banded, abutments, or third molars were not included in the tooth count); the volunteers signed the written consent before the initiation of the study.

The exclusion criteria were the following: periodontal disease (defined as 4 mm and/or positive bleeding when probing), pregnant or breastfeeding, subjects with fixed or removable prosthesis, tumour pathology in oral cavity, use of antibiotics during a 2-month period prior to the start of the trial, hypersensitivity to red fruits in general, xerostomy, active smoker, contagious-infectious pathologies, pathology with severe systemic repercussions, any other judgment that makes the investigator believe to endanger or risk the subject participant, subjects with phenylketonuria or allergy to aspartame, and the use of any oral hygiene product during the study.

A single examiner previously calibrated determined assessment of patient eligibility for the study and enrolment of patients into trial. Patients eligible for the study were individually randomly assigned to oligomeric proanthocyanidins nutritional supplement treatment or placebo groups by an informatics programme by LACER S.A.

The study was double-blind. The examiner and the patient did not know into which group they were assigned. The results were treated by another examiner who knew which patients belonged to the experimental or placebo group. The masking process was established by a number assignation to each patient in the study, and the treatment was the same both for the patient and the examiner who were not allowed to know to which group they belonged.

Patients had to take the experimental or placebo treatment each night after dinner and after a rinse with water. The pill was maintained in the mouth until complete dissolution. Neither drinking nor eating was allowed during 30 minutes after taking the treatment. The experimental treatment consisted of 90 mg exocian cran 408 (equivalent to 36 mg OPCs) and 120 mg of vitamin C, while the placebo group was composed of the same organoleptic substance but free of active ingredients.

Both were similar in appearance. No complementary hygiene methods were allowed during the 21 days (tooth brushing, rinses or irrigation with any product, or flossing), which could constitute a bias for the study.

At the trial baseline stage, a tartar removal was carried out in each patient to regularize the initial situation; a patient diary, enough medication for the entire study, and instructions were given for its correct fulfillment. The inflammation of the crevicular fluid (IL6) and the brightness of the gingiva were registered.

Two evaluation visits were performed on days 14 and 21 of the study for an oral clinical examination and to register the Silness and Løe index, the gingival bleeding index, the Turesky plaque index, the inflammatory crevicular fluid study (IL6), and changes in the brightness of the gingiva.

**2.2. Silness and Løe Index [26, 27].** Six teeth were examined according to Ramfjord criteria (16-21-24-36-41-44). Four surfaces of each tooth were examined, making a total of 24 measurements. These measurements were performed with a periodontal probe by the same examiner.

**2.3. Gingival Bleeding Index [28].** A periodontal probe was used to take this index. The values established for this examination are 0—absence of inflammation; 1—mild inflammation, slight change in color, no gingival edema, and no bleeding on probing; 2—moderate inflammation, redness, edema, and gingival hypertrophy, and bleeds to probe (after 10 seconds); 3—severe inflammation, marked redness, and hypertrophy. There may be ulcerations; the gingiva tends to be spontaneous in bleeding.

**2.4. Turesky Plaque Index [29, 30].** The buccal surfaces of the anterior teeth were examined using a mouthwash of basic fuchsin as developing agent plaque, and the following numerical scoring system from 0 to 5 was established: 0—there is no plaque; 1—independent streaks of plaque in the cervical margin of the tooth; 2—a thin continuous band of plaque (up to 1 mm) at the cervical margin; 3—a band greater than one millimeter wide, but covers less than one-third of the crown; 4—the plaque covers a third, but not more than two-thirds of the crown; 5—the plaque covers two-thirds or more of the crown.

**2.5. Inflammatory Crevicular Fluid Study (IL6) [7–9].** Crevicular fluid samples were collected from interdental areas (lingual, buccal, mesial, and distal) of six teeth distributed in the four quadrants (16, 21, 24, 36, 41, and 44) using five strips of pressed paper that were 2 cm long, especially for crevicular fluid. The impregnation time for each patient was 5 seconds, and the strips were immediately inserted into microtubes that contained 0.5 ml of Eppendorf with 50  $\mu$ l saline at 4°C for preservation. The samples were then transported to the biological laboratory in a refrigerator and were stored frozen at –80°C at the laboratory until they were processed.

Then, we proceeded to analyze the concentration (pg/ml) of interleukin 6 present in each sample using panels 96-well bioplex brand Luminex®.

TABLE 1: Groups characteristics.

		Experimental (n = 10)	Control (n = 10)	p
Sex	Men	2	5	0.674
	Women	8	5	
Years		24.6 $\pm$ 4.27	23.5 $\pm$ 1.64	0.525
Weight (Kg)		57.04 $\pm$ 9.33	66.6 $\pm$ 16.43	0.420
Height (cm)		164.7 $\pm$ 8.02	169.3 $\pm$ 8.59	0.325
Smoker	Yes	0	0	1.000
	No	10	10	
Alcohol	Yes	1	1	1.000
	No	9	9	
Medical treatment	Yes	1 (ACO)	0	0.875
	No	9	10	

**2.6. Brightness of the Gingiva.** The brightness of the gingiva was taken to identify possible changes in the gingival color. The reddening of the gingiva accompanies the inflammation of the tissue, which is a factor that may help to differentiate inflammatory changes at this level.

The luminosity of the gingiva was registered with Micro SpectroShade™ MHT Optic Research AG. This instrument is designed to take dental color. However, besides including color guides, the SpectroShade has the ability to measure the brightness of any color, not just shades of white. The change of color of the gingiva was observed in each patient, and the color reference was measured in the same point in each evaluation visit, which helped us compare the change in the coloration of the same point.

**2.7. Statistical Analysis.** The management of the data was performed using the SPSS statistical program. A similar database to Notebook Data Collection was created. There are a minimum range and a maximum range for each variable, and the name of the variable and its values were defined. The data are presented as the mean  $\pm$  standard deviation of the measurements, and a p value less than 0.05 was considered statistically significant.

Chi-square test was performed to qualitative variable and Student's t-test to the quantitative variable, after the Kolmogorov-Smirnov to assure the normality.

The Ethical Committee approved this study, and all examinations and treatments were performed with the consent of the subjects and according to the guidelines of the Declaration of Helsinki.

### 3. Results

A statistical analysis between the two study groups, 10 patients in each group, in terms of sex, age (years), weight (kg), height (cm), tobacco use, alcohol, and use of concomitant medication, was carried out to ensure the reliability of the results. We found no significant differences between the study group and the control group, so we can say that the homogeneity between the groups was achieved (Table 1).

TABLE 2: Silness and Löe, gingival bleeding, and plaque index.

Test	Evaluation visits	Experimental	Control	<i>p</i>
Silness and Löe index	Day 14	0.65 ± 0.58	1.24 ± 0.66	0.0001
	Day 21	0.97 ± 0.54	1.48 ± 0.60	0.0001
Gingival bleeding index	Day 14	0.91 ± 0.84	1.33 ± 0.75	0.005
	Day 21	0.98 ± 0.67	1.61 ± 0.66	0.0001
Plaque index	Day 14	1.68 ± 0.79	1.25 ± 0.91	0.006
	Day 21	3.35 ± 1.59	1.68 ± 1.43	0.0001

TABLE 3: Brightness of the gingiva.

Brightness of the gingiva	Experimental	Control	<i>p</i>
Baseline	30.75 ± 4.19	31.37 ± 3.55	0.351
Day 14	32.70 ± 3.48	31.50 ± 3.10	0.480
Day 21	32.57 ± 4.72	31.22 ± 2.52	0.425
Dif (day 21 and day 14)	-0.12 ± 1.85	-0.28 ± 1.92	0.545

The medication perception of both groups, as the initial flavour, the product durability, the appearance, size, and efficiency, was the same; there were no statistically significant differences between the data obtained (Table 1). No adverse events were notified during the study.

Once the study groups were analysed, the data processing was conducted depending on the different views held.

**3.1. Periodontal Index to 15 Days for Treatment (Intermediate Visit).** The Silness and Löe gingival index (of 0–3 from least to greatest gingival inflammation) (Table 2) was higher in the control group than in the experimental group, reaching a twofold difference between the two groups ( $p < 0.0001$ ). The gingival bleeding index also corroborates this fact, as the bleeding was lower in the experimental group versus the control group ( $p < 0.005$ ) (Table 2).

In contrast to the values obtained in the Silness and Löe and gingival bleeding indexes, the amount of dental plaque deposited on the surface of the patients according to the Turesky index plaque was slightly higher (33%) in the experimental group versus in the control group ( $p < 0.006$ ) (Table 2).

**3.2. Periodontal Index to 21 Days for Treatment (Final Visit).** The results obtained 21 days after starting the treatment showed the tendency observed in the intermediate visit, increasing the difference between the study groups.

Silness and Löe index was higher in the control group compared to the experimental group, with a difference of 50% between the study groups ( $p < 0.0001$ ). The gingival bleeding index, which showed bleeding in the control group, was higher in the experimental group ( $p < 0.0001$ ).

However, the plaque deposition was higher in the experimental group than in the control group according to the Turesky plaque index having plaque deposit doubled in the patients in the experimental group ( $p < 0.0001$ ) (Table 2).

**3.3. Gingival Brightness.** The gingival brightness was taken in each patient using the Micro SpectroShade Optic Research

TABLE 4: IL-6 in the crevicular fluid (pg/ml).

IL-6 in the crevicular fluid (pg/ml)	Experimental	Control	<i>p</i>
Baseline	62.85 ± 45.8	126.60 ± 54.03	0.011
Day 14	17.95 ± 13.02	47.40 ± 33.61	0.019
Day 21	22.15 ± 15.14	69.40 ± 50.10	0.011
Dif (day 14—baseline)	44.90 ± 44.05	79.20 ± 64.54	0.095
Dif (day 21—baseline)	-40.70 ± 45.02	-56.70 ± 70.63	0.245
Dif (day 21 and day 14)	-4.20 ± 3.21	-22.00 ± 21.03	0.016

MHT AG. This value was taken at the beginning, middle visit, and in the final visit. The data obtained from these three measurements in each patient showed no statistically significant differences ( $p$  values from 0.351 to 0.545) (Table 3).

**3.4. Inflammatory Crevicular Fluid Study (IL6).** Statistically significant differences were found at the baseline between the experimental group and the control group and in the subsequent visits. No statistically significant differences between the first visit and the second visit, and the first and third visits were found, although it was significant between the second visit and the third visit (Table 4).

## 4. Discussion

Gingivitis is caused by deposition of plaque on the tooth surface; this deposition constitutes an irritant that triggers the gingival inflammation and bleeding. Gingivitis could be reversible if the patient has a constant and good hygiene. These measures could be carried out by a proper brushing technique [1–5].

The drug used in the current study is a nutritional supplement based on blueberry and red fruit rich in oligomeric proanthocyanidins (OPCs) [7]. Proanthocyanidins have been recently investigated, as we suggested in the introduction, due to their powerful antioxidant and anticancer activities and due to their anti-inflammatory, antimicrobial, and vasodilator systemical properties. The beneficial effect of proanthocyanidins is attributed to its ability to reduce oxidative stress, lipid peroxidation, free radical generation, and LDL oxidation [11].

Mohana et al. published a study in 2015 about the effect of the OPCs in the prevention and treatment of atherosclerosis. Oxidation of low-density lipoproteins (OxLDL) has been strongly suggested as a key factor in the pathogenesis of atherosclerosis [11]. Due to the antioxidant action of the

proanthocyanidins and the modulation of macrophage differentiation, Mohana et al. reported the benefit of the product as prevention and treatment of the atherosclerosis [11].

Wang et al. have also tested the anti-inflammatory mechanisms of OPCs [12]. They designed an in vivo study in mouse models to investigate the protective effect of OPCs against alcohol-induced liver steatosis and injury. The results showed that OPC significantly improved alcohol-induced dyslipidemia and alleviated liver steatosis by reducing levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low-density cholesterol (LDL-c), and liver malondialdehyde (MDA) and increasing levels of serum high-density lipoprotein (HDL-c) and liver superoxide dismutase (SOD). Further investigation indicated that OPC markedly decreased the expressions of lipid synthesis genes and inflammation genes such as sterol regulatory element binding protein-1c (Srebp-1c), protein-2 (Srebp2), interleukin IL-1b and IL-6, and TNF- $\alpha$  10.

These studies suggested that an effect in the inflammation genes and mediators could be modified by the OPCs, reducing the inflammation obtained [11, 12]. Our results do not show significant differences in the IL-6 between the baseline and the second visit and between the baseline and the third visit. Significant differences were found between the 14th and 21st days and between groups in each visit, including in the baseline stage, so the groups were not similar at the beginning of the study, which could be a bias in the results. That reason forces us to not consider significantly the results obtained. However, the data is lower in the experimental group in each visit and this fact suggests that an effect could be in the IL-6, but we cannot assure this like in other studies because of our difference in the baseline group. However, the clinical parameters, the L $\ddot{o}$ e and Silness index and gingival bleeding index, showed us that the clinical inflammation was higher in the control group than in the experimental group, finding statistically significant differences.

During the study, we observed that the deposition of plaque, L $\ddot{o}$ e and Silness index, gingival bleeding index, and the brightness of the gingiva, increased sequentially, so the inflammatory factors must have also increased due to the results obtained in each parameter, although there were no differences between the study groups in the brightness of the gingiva. We attribute this fact to the mechanical irritant that the plaque constitutes itself, without taking into account its nature.

Besides the anti-inflammatory effect, OPCs have shown antimicrobial effect, reported by further studies [10–16, 23, 25]. This property also justifies testing the effectiveness of the OPCs in periodontal disease. After performing the current study, we can affirm that the OPCs have an effect in the health of the periodontal tissues, as we could see through the Silness and L $\ddot{o}$ e and gingival bleeding indexes, which were significantly lower in the experimental group than in the control group, although it was not corroborated by the Turesky plaque index, where the presence of plaque was paradoxically higher by 33% in the study group than in the control group (Table 1).

These results lead us to suspect that this supplement certainly has antimicrobial effect, since the gingival bleeding index and Silness and L $\ddot{o}$ e index were lower even in the presence of more dental plaque, so the nature of the plaque must be modified, possibly because of a change in the pH or by a different bacterial composition. In March 2015, Mahesh et al. published in the Contemporary Clinical Dentistry a randomized parallel clinical trial comparing a 0.2% chlorhexidine gluconate mouthwash versus a 0.6% cranberry mouthwash on *Streptococcus mutans* in 50 subjects, obtaining similar results in the colonisation of this bacteria in the plaque [25]. This study confirms the results obtained in our clinical trial, in which we hypothesised that the plaque could be different because of the minor inflammation of the periodontal tissue.

Until this moment, only one study has been published about the use of cranberry mouthwash (a component of OPCs) in periodontal disease in humans [25]. However, in 2011, L $\ddot{o}$ hr et al. published an in vitro study about the antimicrobial effect of the OPCs acting in the adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to KB cells [23]. They postulated that the OPCs had an antiadhesive effect against *P. gingivalis* in the KB cells. The results of this study showed that OPCs exert antiadhesive effects against *P. gingivalis*, concluding that OPCs may be useful for the prevention of *P. gingivalis*-associated periodontal diseases [23]. Our study does not include bacterial analysis, but our results support it due to the fact that in the experimental group the parameters showed less inflammation and less cell response to the plaque, which could be attributed to its nature.

Due to the previous study [23], we suspect that the anti-adhesion effect modified the plaque of the subjects in the experimental group, making the inflammation lower. L $\ddot{o}$ rh et al. showed that polyphenols interact with protein surface (e.g., gingipains, predominantly because of its activity against Arg-gingipain) and change the functionality and reactivity. Thus, OPCs mainly interact with the initial adhesion process of the bacteria to the cell membrane. This process could be extrapolated to our study, giving us an explication of our results. IL-6 has not shown significant differences, but a real effect in the inflammation of the gingiva took place in our patients; thus, the L $\ddot{o}$ e and Silness index and gingival bleeding index were lower in the experimental group.

## 5. Conclusion

The nutritional supplement made of oligomeric proanthocyanidins (cranberry and vitamin C) induces an improvement in the health of the periodontal tissues, since the Silness and L $\ddot{o}$ e index and gingival bleeding index were markedly lower in the experimental group, although that supplement has not been shown to have effects on the accumulation of plaque on the tooth surface. Further studies are needed to determine the nature of the plaque.

## Disclosure

The abstract was presented as a poster in the Journal of Clinical Periodontology, in the special issue Abstracts of

EuroPerio8, London, UK, 3–6 June as per the below URL (page 48, D056): <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jcpe.12398/epdf>.

## Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest in this study.

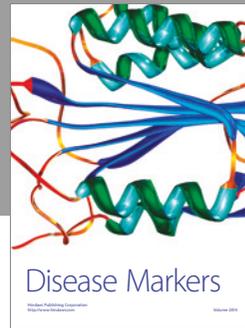
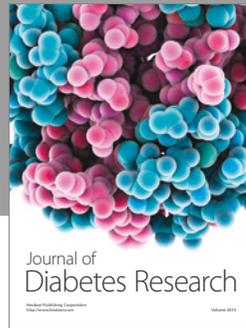
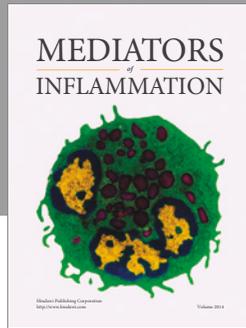
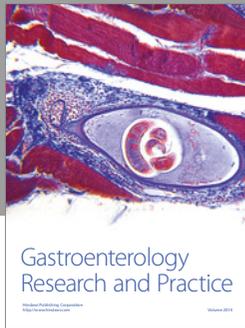
## Acknowledgments

The authors thank Mr. Modesto Carballo from the Biology Department of CITIUS (University of Seville). LACER S.A. financed the present study.

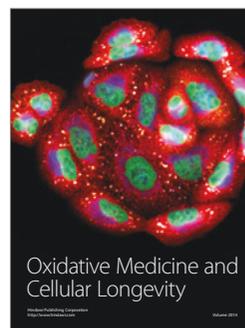
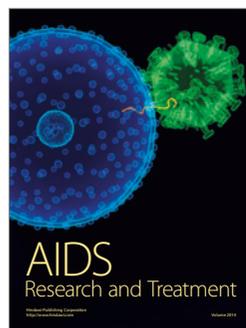
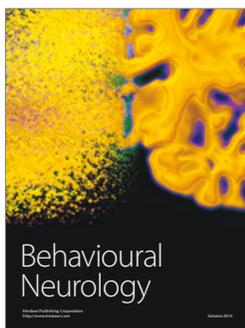
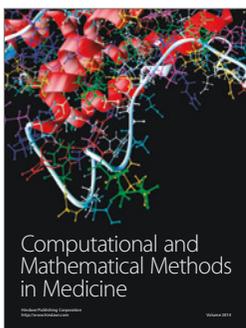
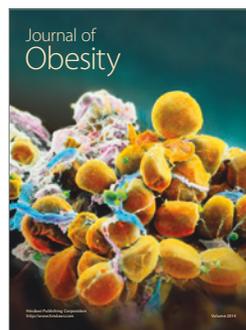
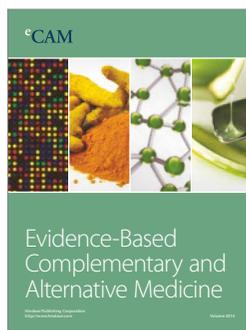
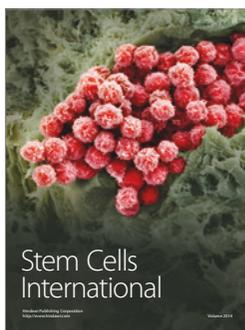
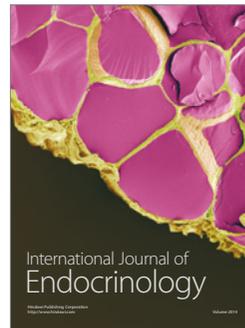
## References

- [1] D. D. Bosshardt and K. A. Selvig, "Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root," *Periodontology 2000*, vol. 13, no. 1, pp. 41–75, 1997.
- [2] B. Syndergaard, M. Al-Sabbagh, R. J. Kryscio et al., "Salivary biomarkers associated with gingivitis and response to therapy," *Journal of Periodontology*, vol. 85, no. 8, pp. e295–e303, 2014.
- [3] T. Morelli, M. Stella, S. P. Barros et al., "Salivary biomarkers in a biofilm overgrowth model," *Journal of Periodontology*, vol. 85, no. 12, pp. 1770–1778, 2014.
- [4] P. Gümüş, Ö. Özçaka, B. Ceyhan-Öztürk, A. Akcali, D. F. Lappin, and N. Buduneli, "Evaluation of biochemical parameters and local and systemic levels of osteoactive and B-cell stimulatory factors in gestational diabetes in the presence or absence of gingivitis," *Journal of Periodontology*, vol. 86, no. 3, pp. 387–397, 2015.
- [5] M. Boronat-Catalá, M. Catalá-Pizarro, and J. V. Bagán Sebastián, "Salivary and crevicular fluid interleukins in gingivitis," *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, vol. 6, no. 2, pp. e175–e179, 2014.
- [6] P. Pozo, M. A. Valenzuela, C. Melej et al., "Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients," *Journal of Periodontal Research*, vol. 40, no. 3, pp. 199–207, 2005.
- [7] T. Hirano, S. Akira, T. Taga, and T. Kishimoto, "Biological and clinical aspects of interleukin 6," *Immunology Today*, vol. 11, no. 12, pp. 443–449, 1990.
- [8] Y. Ishimi, C. Miyaura, C. H. Jin et al., "IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption," *The Journal of Immunology*, vol. 145, pp. 3297–3303, 1990.
- [9] T. Kobayashi, K. Ishida, and H. Yoshie, "Increased expression of interleukin-6 (IL-6) gene transcript in relation to IL-6 promoter hypomethylation in gingival tissue from patients with chronic periodontitis," *Archives of Oral Biology*, vol. 69, pp. 89–94, 2016.
- [10] Z. Xu, P. Du, P. Meiser, and C. Jacob, "Proanthocyanidins: oligomeric structures with unique biochemical properties and great therapeutic promise," *Natural Product Communications*, vol. 7, no. 3, pp. 381–388, 2012.
- [11] T. Mohana, A. V. Navin, S. Jamuna, M. S. Sakeena Sadullah, and S. Niranjali Devaraj, "Inhibition of differentiation of monocyte to macrophages in atherosclerosis by oligomeric proanthocyanidins –*In-vivo* and *in-vitro* study," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 82, pp. 96–105, 2015.
- [12] Z. Wang, B. Su, S. Fan, H. Fei, and W. Zhao, "Protective effect of oligomeric proanthocyanidins against alcohol-induced liver steatosis and injury in mice," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 458, no. 4, pp. 757–762, 2015.
- [13] S. Jin, Eerdunbayaer, A. Doi et al., "Polyphenolic constituents of *Cynomorium songaricum* Rupr. and antibacterial effect of polymeric proanthocyanidin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, no. 29, pp. 7297–7305, 2012.
- [14] M. Miyake, K. Ide, K. Sasaki, Y. Matsukura, K. Shijima, and D. Fujiwara, "Oral administration of highly oligomeric procyanidins of *Jatoba* reduces the severity of collagen-induced arthritis," *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 72, no. 7, pp. 1781–1788, 2008.
- [15] E. M. Kimmel, M. Jerome, J. Holderness et al., "Oligomeric procyanidins stimulate innate antiviral immunity in dengue virus infected human PBMCs," *Antiviral Research*, vol. 90, no. 1, pp. 80–86, 2011.
- [16] E. M. Varoni, G. Lodi, A. Sardella, A. Carrassi, and M. Iriti, "Plant polyphenols and oral health: old phytochemicals for new fields," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 19, no. 11, pp. 1706–1720, 2012.
- [17] N. H. Gokhale, A. B. Acharya, V. S. Patil, D. J. Trivedi, and S. L. Thakur, "A short-term evaluation of the relationship between plasma ascorbic acid levels and periodontal disease in systemically healthy and type 2 diabetes mellitus subjects," *Journal of Dietary Supplements*, vol. 10, no. 2, pp. 93–104, 2013.
- [18] P. Lingstrom, S. Fure, B. Dinilzen, C. Fritzne, C. Klefbom, and D. Birkhed, "The release of vitamin C from chewing gum and its effects on supragingival calculus formation," *European Journal of Oral Sciences*, vol. 113, no. 1, pp. 20–27, 2005.
- [19] M. Nishida, S. G. Grossi, R. G. Dunford, A. W. Ho, M. Trevisan, and R. J. Genco, "Dietary vitamin C and the risk for periodontal disease," *Journal of Periodontology*, vol. 71, no. 8, pp. 1215–1223, 2000.
- [20] L. Bonifait and D. Grenier, "Cranberry polyphenols: potential benefits for dental caries and periodontal disease," *Journal of the Canadian Dental Association*, vol. 76, article a130, 2010.
- [21] P. J. Leggott, P. B. Roberlson, R. A. Jacob, J. J. Zambon, M. Walsh, and G. C. Armitage, "Effects of ascorbic acid depletion and supplementation on periodontal health and subgingival microflora in humans," *Journal of Dental Research*, vol. 70, no. 12, pp. 1531–1536, 1991.
- [22] M. K. Vaananen, H. A. Markkanen, V. J. Tuovinen, A. M. Kullaa, A. M. Karinpaa, and E. A. Kumpusalo, "Periodontal health related to plasma ascorbic acid," *Proceedings of the Finnish Dental Society*, vol. 89, no. 1-2, pp. 51–59, 1993.
- [23] G. Löhr, T. Beikler, A. Podbielski, K. Standar, S. Redanz, and A. Hensel, "Polyphenols from *Myrothamnus flabellifolia* Welw. inhibit in vitro adhesion of *Porphyromonas gingivalis* and exert anti-inflammatory cytoprotective effects in KB cells," *Journal of Clinical Periodontology*, vol. 38, no. 5, pp. 457–469, 2011.
- [24] J. Govindaraj, P. Emmadi, Deepalakshmi, V. Rajaram, G. Prakash, and R. Puvanakrishnan, "Protective effect of proanthocyanidins on endotoxin induced experimental periodontitis in rats," *Indian Journal of Experimental Biology*, vol. 48, no. 2, pp. 133–142, 2010.

- [25] R. Mahesh, M. Khairnar, G. N. Karibasappa et al., "Comparative assessment of cranberry and chlorhexidine mouthwash on streptococcal colonization among dental students: a randomized parallel clinical trial," *Contemporary Clinical Dentistry*, vol. 6, no. 1, pp. 35–39, 2015.
- [26] J. Silness and H. Loe, "Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition," *Acta Odontologica Scandinavica*, vol. 22, no. 1, pp. 121–135, 1964.
- [27] H. Loe, "The gingival index, the plaque index and the retention index systems," *Journal of Periodontology*, vol. 38, no. 6, Part II, pp. 610–616, 1967.
- [28] H. G. Carter and G. P. Barnes, "The gingival bleeding index," *Journal of Periodontology*, vol. 45, no. 11, pp. 801–805, 1974.
- [29] S. Turesky, N. D. Gilmore, and I. Glickman, "Reduced plaque formation by the chloromethyl analogue of vitamin C," *Journal of Periodontology*, vol. 41, no. 1, pp. 41–43, 1970.
- [30] G. A. Quigley and J. W. Hein, "Comparative cleansing efficiency of manual and power brushing," *The Journal of the American Dental Association*, vol. 65, no. 1, pp. 26–29, 1962.



**Hindawi**  
Submit your manuscripts at  
<https://www.hindawi.com>



Anexo 11. Accésit del Premio Colegio Oficial de Dentistas de Sevilla y Fundación Real Academia de Medicina y Cirugía de Sevilla.



FUNDACIÓN REAL ACADEMIA  
DE MEDICINA Y CIRUGÍA DE SEVILLA



D. ALBERTO GARCÍA-PERLA GARCÍA, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA,  
ACADÉMICO CORRESPONDIENTE DE LA RAMSE, PATRONO Y SECRETARIO DE  
ESTA FUNDACIÓN.

CERTIFICA:

Que **Dña. Rosa María Díaz Sánchez** ha obtenido el **Accésit del Premio Colegio Oficial de Dentistas de Sevilla**, al mejor trabajo sobre tema libre socio-sanitario odontológico, por el trabajo titulado "Estudio de la prevención de la gingivitis con complemento exocian cran 40s y vitamina C", en el Concurso Anual de Premios Científicos de la Fundación Real Academia de Medicina y Cirugía de Sevilla del año 2014.

Sevilla, 19 de enero de 2015

Dr. D. Alberto García-Perla

VºB del Presidente



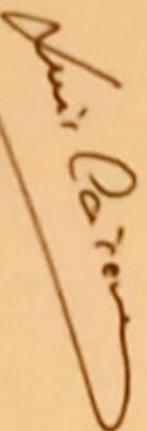
Dr. D. Jesús Castiñeiras Fernández



## El Colegio Oficial de Dentistas de Sevilla CERTIFICA

Da ROSA MARÍA DÍAZ SÁNCHEZ

Ha obtenido el **Accésit del Premio Colegio Oficial de Dentistas de Sevilla**, al mejor trabajo sobre tema libre socio-sanitario odontológico, por el trabajo titulado "*Estudio de la prevención de la gingivitis con complemento exocian cran 40s y vitamina C*", en el Concurso Anual de Premios Científicos de la Fundación Real Academia de Medicina y Cirugía de Sevilla del año 2014



Vº Bº  
El Presidente

Sevilla, 19 de Enero de 2015



Por la  
Comisión Científica

Anexo12. Certificado comunicación internacional  
Europerio 8 celebrado en Londres del 3 al 6 de  
Junio de 2015.

Prospective Double-Blind Randomized  
Controlled Clinical Trial in the Gingivitis  
Prevention with an Oligomeric  
Proanthocyanidins Nutritional Supplement.



# CERTIFICATE OF POSTER PRESENTATION

This is to certify that

**Ms. Rosa Díaz-Sánchez**

Presented a Poster Communication:

**Prospective Double-Blind Randomized Controlled Clinical Trial in the Gingivitis Prevention with an Oligomeric Proanthocyanidins Nutritional Supplement**

At EuroPerio8

8<sup>TH</sup> CONFERENCE OF THE EUROPEAN  
FEDERATION OF PERIODONTOLOGY

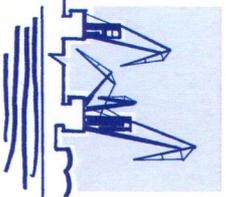
from June 3 – 6, 2015  
**LONDON**, United Kingdom, ExCeL London

**Francis Hughes**  
EuroPerio8 Chairman

Anexo 13. Certificado de comunicación nacional presentada en XIII Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Bucal celebrado en Bilbao los días 29 a 31 octubre. Ensayo clínico controlado prospectivo a doble ciego sobre la prevención de la gingivitis con suplemento nutricional a base de proantocianidinas oligoméricas.

**SECIB**

**BILBAO2015**  
29-31 OCTUBRE



Palacio de Congresos y de la Música  
Euskalduna Jauregia Bilbao

"EXIGE CIENCIA,  
EXIGE RESPUESTAS"

**XIII CONGRESO NACIONAL  
DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA  
DE CIRUGÍA BUCCAL**

**CERTIFICADO DE COMUNICACIÓN ORAL**

Certificamos que,

**Rosa María Díaz; Vanessa Montoya; María del Carmen Vázquez;  
José María Delgado; Daniel Torres; Jose Luis Gutiérrez**

han presentado la **Comunicación Oral** que lleva por título

**ENSAYO CLÍNICO CONTROLADO PROSPECTIVO A DOBLE CIEGO SOBRE  
LA PREVENCIÓN DE LA GINGIVITIS CON SUPLEMENTO NUTRICIONAL**

en el **XIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía Bucal**, celebrado del **29 al 31 de octubre de 2015**.

Para que así conste, a todos los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Bilbao, a treinta y uno de octubre de dos mil quince.

**Agurne Uribarri Etxebarria**  
Presidenta del Comité Organizador

**David Gallego Romero**  
Presidente de la SECIB

**SECIB**  
Sociedad Española de  
Cirugía Bucal

Anexo 14. Certificado de comunicación internacional presentada en la I Jornada Internacional de Investigación en Ciencias de la Salud organizada por el Grupo de Investigación CTS-941, Universidad de Sevilla y celebrado en Sevilla el 16 de octubre de 2015. Ensayo clínico controlado prospectivo a doble ciego sobre la prevención de la gingivitis con suplemento nutricional a base de proantocianidinas oligoméricas.



# I JORNADA INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA SALUD

Organizada por el Grupo de Investigación CTS-941, Universidad de Sevilla

## CERTIFICADO

Comunicación Oral/Póster:

Díaz Sánchez RM, De Paz Carrión A, González Martín MI,  
Delgado Muñoz JM, Torres Lagares D, Gutiérrez Perez JL

*Ensayo clínico controlado prospectivo a doble  
ciego sobre la prevención de la gingivitis con  
suplemento nutricional a base de  
proantocianidinas oligoméricas*

Dr. Juan José Segura Egea  
Presidente Comité Científico



Dra. Jenifer Martín González  
Presidenta del Comité Organizador

Sevilla, a 16 de Octubre de 2015.