

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD CARIOSTATICA EN LA RATA
DE UNA NUEVA FORMA FARMACEUTICA DEL FLUOR.

Trabajo de fin de licenciatura presentado por **Alex Fernández Solanas**, dirigido por la
Dra. Silvia Sánchez.

Unitat de Farmacologia de la Facultat d'Odontologia de Barcelona.

L'Hospitalet de Llobregat, Setembre del 1993.





UNIVERSITAT DE BARCELONA Divisió de Ciències de la Salut

Pabelló de Govern 1ª planta
c/. Feixa Llarga, s/n - Hospital de Bellvitge
08907 L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona)

Facultat d'Odontologia

La Dra. Silvia Sánchez, Professor de
l'assignatura de Farmacologia,
del Departament de Farmacologia
d'acord amb el punt 2.9 de la normativa per a l'obtenció
del Títol de Llicenciat en Odontologia,

FAIG CONSTAR: Que el treball de fi de llicenciatura de
l'alumne Alex Fernández Solanas,
de títol Estudio de la capacidad cariostática
en la rata de una nueva forma farmacéutica
del flúor.
compleix els requisits per ser presentat i
qualificat davant del Tribunal que oportuna-
ment es nomeni.

L'Hospitalet, 4 de setembre de 1993

Silvia Sánchez

Signatura Professor

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Silvia Sánchez**, directora de este trabajo de fin de licenciatura, por los consejos y los ánimos recibidos a lo largo de este año.

A los **Dres. Jordi Olivé y Pedro González**, impulsores de esta línea de investigación, por la ayuda prestada y las horas dedicadas.

A los amigos **Xavier Planelles y Javier Pascual** por su colaboración pero sobre todo, por todo lo demás.

Muy especialmente, al **Dr. Jordi Martínez** y a **Salud Sánchez** por su paciencia, la amistad brindada y por dejarme colaborar con ellos durante este año. Sin su ayuda, este trabajo sería, sin duda, muy diferente.

A mis padres, **Martín y Montse**, a mi hermana, **Marta**, y a **Natalia** por todo aquello que no puedo exponer en estas líneas porque no sé hacerlo y porque, si lo hiciese, lo haría entrando en el terreno de la cursilería.

A TODOS ELLOS, ¡ MIL GRACIAS !

INDICE

INDICE

I/ INTRODUCCION.....	10
II/ LA CARIES DENTAL, UNA ENFERMEDAD MULTIFACTORIAL.....	13
II.1/ DEFINICION Y ETIOLOGIA.....	13
A/ FACTORES GENERALES.....	14
B/ FACTORES LOCALES.....	15
II.2/ SALIVA Y CARIES.....	17
II.2.1/ FUNCIONES DE LA SALIVA.....	17
II.2.2/ SITUACIONES DE XEROSTOMIA.....	19
II.2.3/ CUADRO CLINICO DE LA XEROSTOMIA.....	21
II.2.4/ TRATAMIENTO DE LA XEROSTOMIA.....	22
II.2.5/ FARMACOS Y XEROSTOMIA.....	24
A/ INTRODUCCION.....	24
B/ CARACTERISTICAS FARMACOLOGICAS DE LA CLOMIPRAMINA.....	25
1/ Características farmacocinéticas.....	25
2/ Mecanismo de acción.....	26
3/ Indicaciones terapéuticas.....	26
4/ Reacciones adversas e interacciones.....	27

III/ FLUOR Y CARIES	29
A/ MECANISMOS DE ACCION	29
A.1/ ACCION DEL FLUOR EN LA DESMINERALIZACION.....	29
A.2/ ACCION DEL FLUOR EN LA REMINERALIZACION.....	31
A.3/ ACCION DEL FLUOR EN LA PLACA BACTERIANA.....	33
A.4/ OTRAS HIPOTESIS.....	36
B/ FLUOR TOPICO	38
C/ FLUOR LIPOSOMADO	41
C.1/ INTRODUCCION.....	41
C.2/ CLASIFICACION Y COMPOSICION.....	43
C.3/ INCLUSION DE MEDICAMENTOS Y APLICACIONES TERAPEUTICAS	45
D/ USO DE SOLUCIONES CALCICAS PARA AUMENTAR LA CAPTACION DE FLUOR POR EL ESMALTE	47
D.1/ INTRODUCCION.....	47
D.2/ MECANISMO DE ACCION.....	48
IV/ RATA Y CARIES	51
IV.1/ INTRODUCCION.....	51
IV.2/ CARACTERISTICAS DENTALES DE LA RATA.....	52

IV.3/ DISEÑO DE UN ESTUDIO EXPERIMENTAL DE CARIES EN LA RATA.....	56
A/ CONDICIONES DE EXPERIMENTACION EN UN ESTUDIO DE CARIES EN LA RATA.....	56
B/ DURACION DEL ESTUDIO Y SEGUIMIENTO DEL ANIMAL.....	59
C/ ELEMENTO BACTERIANO.....	62
D/ DIETA CARIOGENICA.....	68
E/ METODOS DE SACRIFICIO Y DE PREPARACION DE LOS MOLARES.....	73
E.1/ Métodos de sacrificio.....	73
E.2/ Preparación de los molares.....	76
F/ TECNICAS DE CUANTIFICACION DE CARIES.....	79
V/ OBJETIVOS.....	85
VI/ MATERIAL Y METODOS.....	86
VI.1/ ESPECIE SELECCIONADA Y PIEZAS DENTALES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO.....	86
VI.2/ DISTRIBUCION, IDENTIFICACION Y SEGUIMIENTO.....	87
VI.3/ DURACION DEL ESTUDIO Y CONDICIONES DE EXPERIMENTACION.....	88

VI.4/ GRUPOS DE TRATAMIENTO.....88

VI.5/ CONDICIONES CARIOGENICAS.....91

**VI.6/ SACRIFICIO DE LOS ANIMALES Y DETERMINACION DEL FLUOR
SALIVAR.....94**

VI.7/ TINCION DE LOS MOLARES Y RECUENTO DE CARIES.....97

VI.8/ TRATAMIENTOS ESTADISTICOS.....105

VII/ RESULTADOS Y DISCUSION.....107

VIII/ CONCLUSIONES.....142

IX/ BIBLIOGRAFIA.....144

I/ INTRODUCCION

Actualmente, la caries se viene considerando como una enfermedad multifactorial en la que intervienen la presencia de placa acidógena, la dieta del individuo y una serie de factores relacionados con el huésped. Ahora bien, se sabe que todos estos factores no son suficientes por sí solos y sólo si están presentes durante un período de tiempo suficiente se desarrolla la enfermedad.

Evidentemente, este período de tiempo es diferente para cada individuo y va a depender de lo que podríamos calificar como virulencia de los tres factores citados anteriormente (dieta, bacteriano y huésped) el que tenga que ser más o menos largo.

Dentro de los factores relacionados con el huésped, uno de los que juegan un papel más importante es la saliva y en concreto la cantidad secretada. Así, está ampliamente documentada la relación existente entre la disminución objetivable de salivación o xerostomía y la incidencia de caries. Este hecho adquiere particular relevancia si tenemos en cuenta los estudios demográficos llevados a cabo en los últimos años que nos muestran como los grupos poblacionales compuestos por personas de edad avanzada son los que están experimentando un mayor crecimiento.

Precisamente es en estos grupos de edad donde el riesgo de padecer procesos de xerostomía es mayor (1). Así, con frecuencia este grupo poblacional está sometido a una polimedicación y no debemos olvidar la presencia en el mercado de cierto número de medicamentos susceptibles de ocasionar como efecto secundario una disminución de la secreción salivar. De entre éstos, sin duda son los antidepresivos tricíclicos unos de los más extendidos lo que nos ha llevado a escoger como agente xerostomiante en nuestro estudio la clomipramina.

Ante esta incidencia cada vez mayor de casos de xerostomía, pensamos que resultaría sumamente interesante el llegar a establecer unas pautas preventivas a base de preparados de flúor con el fin de intentar disminuir la incidencia de caries que sin duda se producirá sin la adopción de estas u otras pautas. Es con esta filosofía que creemos indicado el proseguir la línea de trabajo iniciada hace 2 años por el Departamento de Farmacología de la Facultad de Odontología de Barcelona consistente en analizar el efecto preventivo del flúor en roedores sometidos a dietas cariogénicas y a xerostomía ocasionada por los antidepresivos tricíclicos.

Nuestra intención sin embargo es avanzar un paso más de manera que, aprovechando los resultados obtenidos a lo largo de estos años, podamos valorar la posible efectividad de una nueva forma de presentación del flúor: el flúor liposomado.

Si bien hasta la fecha no existe bibliografía alguna concerniente a la incorporación de medicamentos en estructuras liposomales con fines odontológicos, los resultados obtenidos con principios activos incluidos en liposomas con otros fines nos animan a iniciar esta línea de investigación. En efecto, en la mayoría de casos los liposomas se han revelado como unos excelentes métodos de liberación retardada de fármacos a la vez que han permitido como veremos más adelante, disminuir sensiblemente la dosis de principio activo necesaria.

Pensamos que la mejor manera de abordar este tema consiste en valorar en primer lugar los conocimientos actuales sobre la caries y su prevención tanto en el ser humano como en los animales de experimentación. Asimismo, una aproximación a los últimos avances producidos en el campo de los fármacos liposomados nos resulta igualmente imprescindible para disponer de un bagaje suficiente que nos permita establecer un correcto protocolo experimental y obtener unas conclusiones válidas.

II/ LA CARIES DENTAL, UNA ENFERMEDAD MULTIFACTORIAL

II.1/ DEFINICION Y ETIOLOGIA

Clásicamente, la caries se define como una enfermedad bacteriana no específica que desencadena un proceso destructivo de los tejidos duros dentarios como consecuencia de la acidificación que supone la fermentación de los hidratos de carbono por parte de los microorganismos. Podemos, a partir de esta definición, empezar a comprender que se considere la caries como una enfermedad multifactorial.

En efecto, vemos en la primera parte de la definición como, al considerar la caries una enfermedad bacteriana, convendrá valorar tanto la cantidad de flora presente como la composición de esta flora. En lo que concierne a esta última, está ampliamente demostrada la importancia de la presencia de estreptococos y de lactobacilos en el desarrollo de los procesos de caries. En concreto se citan como los de mayor actividad, los *Mutans* dentro de los estreptococos y los acidófilos dentro de los lactobacilos.

Si lo que consideramos es la parte intermedia de la definición, aquella que considera el tejido duro dentario como el que padece la enfermedad, entenderemos que el desarrollo de la enfermedad va a variar en cada individuo en función de una serie de factores que pasamos a analizar.

Estos factores relacionados con el huésped pueden diferenciarse en generales y en locales, veamos pues en que consisten.

A/ FACTORES GENERALES

1/ Herencia y raza:

Se han relacionado en diferentes períodos como posibles variables que intervendrían en la incidencia de caries pero parece probado que lo que realmente interviene es el modo de vivir.

2/ Distribución geográfica:

Aquí intervendrían la presencia de suelos más o menos ricos en sales cálcicas y fosfóricas así como en flúor.

3/ Enfermedades generales:

En efecto, procesos como algunos trastornos digestivos en la primera infancia, displasias congénitas y en general todas aquellas situaciones que puedan afectar al correcto desarrollo de los tejidos dentarios son susceptibles de variar la incidencia de caries.

4/ Profesión:

Así, la ingestión o contacto exagerados con sustancias ricas en hidratos de carbono como resultado de la actividad laboral desarrollada van a determinar de no mediar unas correctas medidas preventivas, una mayor incidencia de caries.

A/ FACTORES LOCALES**1/ Factores dentales:**

Destacamos aquí el papel que juegan la composición y estructura del esmalte, la presencia de fisuras profundas, el contenido en flúor y otros oligoelementos, la presencia de displasias, de malposiciones o de maloclusiones.

2/ Factores salivales:

Analizaremos la relación entre xerostomía y caries más adelante con mayor detenimiento pero podemos ya aquí comprender la importancia de la saliva en el desarrollo de esta enfermedad si tenemos en cuenta las variables a que está sometida en cuanto a su: volumen de secreción, composición (contenido sobre todo de calcio, fosfatos, flúor, glucoproteínas) y presencia de enzimas como la lisozima en mayor o menor medida .

Finalmente, si consideramos la última parte de la definición, vemos que la acidificación consecuente de la fermentación de los hidratos de carbono resulta ser la última responsable de la destrucción del tejido dentario, comprenderemos entonces la importancia de la dieta del individuo en la mayor o menor incidencia de caries.

En efecto, la dieta va a determinar entre otros, los siguientes aspectos:

- 1/ Tiempo de permanencia del bolo alimenticio en la cavidad oral.
- 2/ Tipo de masticación y por tanto, grado de salivación.
- 3/ Aporte de nutrientes necesarios para el correcto desarrollo del individuo.
- 4/ Cantidad de hidratos de carbono fermentables por los microorganismos cariogénos.

En definitiva, hemos visto como en el desarrollo de la caries van a intervenir factores microbianos, factores relacionados con el huésped y, por último, el tipo de dieta.

Pasamos ahora sin embargo a analizar con mayor detenimiento cual es papel que juega uno de los factores relacionados con el huésped que ya hemos citado anteriormente: la saliva.

II.2/ SALIVA Y CARIES

La relación entre saliva y caries ha sido demostrada y aceptada desde hace numerosos años. Pasamos pues a recordar algunas de las funciones de la saliva que pueden ayudar a comprender mejor las graves repercusiones que conlleva una disminución de su secreción.

II.2.1/ FUNCIONES DE LA SALIVA

Conviene señalar en un inicio el papel evidente que desarrolla la saliva en procesos tales como la digestión, la degustación, la fonación, el mantenimiento del equilibrio acuoso o la lubricación y protección de la mucosa oral.

No son éstas sin embargo las únicas funciones de la saliva. En concreto, podemos señalar una serie de ellas que van a estar estrechamente relacionadas con el mantenimiento de la integridad de las piezas dentales ante la enfermedad (2 y 3):

1/ La saliva resulta fundamental para la limpieza física de las piezas y el desalojo y dilución de los restos alimentarios que pudieran permanecer en la cavidad oral.

2/ Contribuye a la remineralización del esmalte mediante su contenido iónico como lo demuestra la reversibilidad de las lesiones cariosas provocadas en animales de experimentación tras la administración de pilocarpina (4).

3/ Es una sustancia tamponadora capaz de mitigar las variaciones de pH.

4/ Influye en la composición y cantidad de flora bacteriana de la cavidad oral por su contenido en compuestos como las inmunoglobulinas, enzimas antibacterianos y otras sustancias como la lisozima, la lactoperoxidasa o la lactoferrina. Por tanto, y como lo demuestran diferentes estudios experimentales, la hiposalivación ocasionará inevitablemente un aumento en el número de microorganismos cariógenos (5).

5/ Al intervenir la saliva en la degustación y la deglución, la xerostomía comportará un cambio en el consumo de alimentos y líquidos a la vez que ocasionará un mayor tiempo de permanencia del alimento en la cavidad oral lo cual puede implicar un mayor riesgo de caries.

II.2.2/ SITUACIONES DE XEROSTOMIA

Una vez establecida la relación entre saliva y caries comprendemos la importancia de señalar aquellas situaciones en que se puede producir un episodio de xerostomía.

- La xerostomía puede ser debida en primer lugar a una alteración en las vías de conducción de los estímulos aferentes es decir en el olfato, la visión o en la sensibilidad de las papilas gustativas.

- En segundo lugar, puede estar ocasionada por una alteración localizada en el sistema nervioso central.

- Igualmente, puede ser debida a un trastorno a nivel de la inervación de las glándulas salivales como sucede por ejemplo en la sialoadenosis.

- Más frecuente es sin embargo que la xerostomía se deba a un déficit en la producción de la saliva ya sea como consecuencia de un proceso compensatorio ante una situación de deshidratación o de un déficit parenquimatoso como sucede en pacientes sometidos a radioterapia de cabeza y cuello o en aquellos que padecen un síndrome de Sjögren caracterizado por la asociación de xerostomía, xeroftalmia y afectación del tejido conectivo.

- Los procesos de xerostomía debidos a una limitación en el transporte de la saliva son en cambio escasos pues el bloqueo bilateral de alguna glándula es en extremo excepcional.

- Podemos citar finalmente aquellos casos de xerostomía aparecidos como consecuencia de una ausencia o de malformaciones congénitas de las glándulas. Pueden incluirse igualmente en este apartado aquellos casos desarrollados tras la extirpación de las glándulas en procesos cancerígenos.

No hemos citado sin embargo hasta este punto una de las causas más frecuentes de xerostomía en nuestros días y tal vez una de las que mayor aumento está experimentado en los últimos años. Se trata de la administración de fármacos entre cuyos efectos secundarios se encuentra la hiposalivación.

Esta relación entre fármacos y xerostomía será analizada con mayor detenimiento en un apartado específico, pasamos por el momento a presentar el cuadro clínico que se presenta ante una disminución de la secreción salivar.

II.2.3/ CUADRO CLINICO DE LA XEROSTOMIA

La sintomatología de la xerostomía suele iniciarse con la sensación por parte del paciente de sequedad de boca y quemazón. Hablaremos entonces de estomatodinia o "boca ardiente" si la disminución de la secreción salivar no puede objetivarse pues el término de xerostomía tan sólo puede ser aplicado con rigor a aquellos casos en que sí es objetivable.

Las mucosas orales adquieren una coloración rojiza evidenciando procesos inflamatorios. El paciente refiere dolor y en numerosos casos puede sufrir infecciones micóticas. Aparecen más tarde dificultades al habla, la masticación y la deglución como consecuencia de la alteración que comporta la hiposalivación en el correcto movimiento de labios y lengua. Igualmente, el paciente describe episodios de disgeusia.

Por otro lado, aquellos pacientes portadores de prótesis referirán problemas en su uso así como la aparición de úlceras por decúbito.

Por último, y esta es una de las motivaciones de nuestro estudio, la incidencia de caries en estos pacientes es notablemente mayor que en el resto de la población lo cual no debe extrañarnos pues ya hemos visto en capítulos precedentes el gran número de funciones de la saliva que podían relacionarse con el mantenimiento de la integridad de las piezas dentales ante el ataque ácido.

En el caso concreto de los pacientes en que se desarrolla un proceso de xerostomía como consecuencia del tratamiento radiológico, la caries suele adoptar un patrón característico con frecuentes afectaciones del área cervical alcanzando cemento y dentina y progresando internamente hasta "decapitar" la corona. En ocasiones, se produce un rápido desgaste de las superficies incisales y oclusales, haya habido o no afectación cervical. Existe además la particularidad de que estas caries suelen ser recurrentes (6).

II.2.4/ TRATAMIENTO DE LA XEROSTOMIA

Ante toda la serie de manifestaciones que hemos visto que acompañan a la xerostomía, comprendemos la importancia de proporcionar una correcta atención y un tratamiento oportuno a aquellos pacientes que sufran un proceso de estas características.

Evidentemente, el tratamiento de la xerostomía debe ir encaminado inicialmente a identificar y tratar la causa que ha originado el proceso. Estaríamos entonces ante un tratamiento etiológico lo cual sería lo más indicado pero por desgracia, no siempre es posible identificar la causa de la xerostomía y, lo que es más frecuente, aún identificada, en numerosos casos esta causa no es modificable. Estamos pensando por ejemplo en aquellas xerostomías desarrolladas en pacientes sometidos a radioterapia o en que les han sido extirpadas las glándulas. Sería el caso igualmente de aquellos procesos debidos a la administración de determinados fármacos no siempre sustituibles o modificables en sus dosis terapéuticas.

En todos estos casos debemos recurrir a un tratamiento sintomático o paliativo basado entre otras, en las siguientes medidas:

- Recomendar una dieta que fuerce la masticación y que presente un alto contenido en proteínas y vegetales.

- Se pueden recetar agonistas colinérgicos muscarínicos como por ejemplo la pilocarpina. De esta manera se conseguirá un aumento del flujo salivar.

- En otros casos, se puede recurrir a la administración de saliva artificial en cantidades variables.

Evidentemente, todas estas medidas van a paliar en la mayoría de casos las repercusiones de la xerostomía pero no por ello debe obviarse el informar al paciente sobre el elevado riesgo de padecer caries a que está sometido. Debemos pues recomendarle una serie de medidas encaminadas a reducir este riesgo:

- Recomendarle el no consumir dulces con el fin de aliviar la sensación desagradable que le produce la sequedad de boca.

- Enseñarle las diferentes medidas de higiene oral existentes y motivarle al respecto.

- Establecer una correcta pauta profiláctica de aplicaciones de suplemento de flúor en función de las necesidades del paciente, de sus preferencias y de las diferentes posibilidades existentes.

II.2.5/ FARMACOS Y XEROSTOMIA

A/ INTRODUCCION

Como hemos visto en el capítulo en que hemos analizado las diferentes situaciones en que puede aparecer un episodio de xerostomía, la administración de fármacos susceptibles de ocasionar este proceso constituye una de ellas.

En concreto, se cita un amplio listado de fármacos con este efecto secundario en el que se incluyen anticolinérgicos, antihistamínicos, antiparkinsonianos, antieméticos, analgésicos narcóticos, sedantes hipnóticos no barbitúricos, antipsicóticos, ansiolíticos y antidepresivos tricíclicos. No hay que olvidar igualmente los efectos xerostomiantes del tabaco y del alcohol.

La elección en nuestro estudio como agente xerostomizante de un antidepresivo tricíclico como la clomipramina se debe por un lado a su amplia utilización actual al ser esta familia de fármacos los de primera elección en el tratamiento de la depresión (7) y por otro a la experiencia acumulada en los últimos años por este departamento en que se ha venido utilizando este fármaco en diferentes estudios con animales de experimentación con el fin de ocasionarles una hiposalivación.

Pasamos pues a describir sus características farmacológicas.

B/ CARACTERISTICAS FARMACOLOGICAS DE LA CLOMIPRAMINA

La clomipramina es un fármaco derivado de la dibenzodiazepina incluido en el grupo de los antidepresivos tricíclicos de primera generación.

1/ Características farmacocinéticas:

Los antidepresivos tricíclicos, y por tanto la clomipramina, son fármacos muy liposolubles que se absorben muy bien en el tubo digestivo. Sin embargo, al estar sometidos a un intenso fenómeno de primer paso, su biodisponibilidad es más bien baja, del orden del 40-60 % en el caso de la clomipramina. Se fijan con intensidad a las proteínas plasmáticas (91 % en el caso del compuesto que nos concierne) y son sometidos a abundantes procesos de metabolización.

Como consecuencia de la elevada liposolubilidad y de la extensa fijación a las proteínas tisulares, presentan un volumen de distribución elevado lo que, combinado con la intensa metabolización, origina una vida media de eliminación con valores medios que permiten administrar el fármaco 1 ó 2 veces al día. Por la misma razón, existen grandes variaciones interindividuales en los niveles plasmáticos estables conseguidos con una misma dosis. Atraviesan la barrera placentaria donde al igual que en la leche materna, alcanzan niveles superiores a los sanguíneos. La clomipramina tiene una vida media de 17-28 horas y un rango de dosis/día de 50-100 mg.

2/ Mecanismo de acción:

Los antidepresivos tricíclicos actúan inhibiendo la recaptación de noradrenalina y 5-hidroxitriptamina tanto en el sistema nervioso central como periférico. Por tanto, su acción terapéutica será el resultado del aumento de estas monoaminas en el espacio sináptico.

3/ Indicaciones terapéuticas:

El síndrome depresivo se caracteriza por ser un estado en el que se combinan de manera variable en intensidad y lapso de tiempo sentimientos de tristeza, desesperanza, retraso psicomotor o agitación, desinterés, ideas de suicidio, anorexia y pérdida de deseo sexual.

El enfermo depresivo mantiene una concepción personal distorsionada con una triple visión negativa: de sí mismo, del mundo que le rodea y del futuro.

Desde la perspectiva de la biología psiquiátrica y aceptando ya desde un inicio la incapacidad actual para presentar una explicación convincente de la etiología de la depresión, hay que decir que, al igual que sucedió con la esquizofrenia, ha sido el análisis de las acciones de los fármacos lo que ha permitido establecer unas ciertas hipótesis patogenéticas.

Así, puesto que la deplección de las monoaminas cerebrales con reserpina desencadena en ocasiones un síndrome depresivo y que por el contrario, el incremento de la actividad monoaminérgica es uno de los mecanismos propuestos en el caso de fármacos antidepresivos como los inhibidores de la MAO o los tricíclicos, se ha sugerido el que la depresión sea el resultado de una insuficiencia funcional en los sistemas neuroquímicos cerebrales, particularmente los serotoninérgicos (5-HT) y noradrenérgicos. Sin embargo, más que considerar la depresión como el resultado de un aumento o de una disminución permanente en la actividad de uno u otro sistema neuroquímico, cabría considerarla como el resultado de una alteración en su regulación.

4/ Reacciones adversas e interacciones :

Se describen numerosas reacciones adversas e interacciones si bien la mayoría son afortunadamente de carácter leve aunque no por ello pueda prescindirse de establecer una adecuada vigilancia.

En el sistema cardiovascular las reacciones adversas pueden abarcar hipotensión ortostática, palpitaciones y taquicardia. La primera aparecerá sobre todo al inicio del tratamiento y en personas de edad avanzada.

Dentro de las reacciones adversas de tipo anticolinérgico se describen la sequedad de boca, sudoración, temblores, vértigos, estreñimiento, retención urinaria, congestión nasal, trastornos de la acomodación que ocasionan visión borrosa y glaucoma. Evidentemente, todos estos trastornos están en función del grado de bloqueo y de las características individuales de cada paciente.

Dentro de las alteraciones de carácter neurológico que ocasionan, destacan las crisis convulsivas que pueden ocasionar por lo que habrá que ir con particular atención en aquellos pacientes más susceptibles. La sedación es muy frecuente aunque se suele desarrollar tolerancia. Puede aparecer igualmente un síndrome anticolinérgico central caracterizado por confusión, desorientación y alucinaciones.

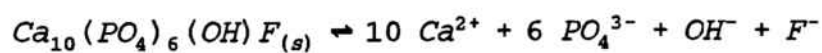
Por último, se han descrito aumentos de peso, hepatitis alérgicas, erupciones dérmicas y reacciones de fotosensibilidad (8 y 9).

III/ FLUOR Y CARIES

A/ MECANISMOS DE ACCION

A.1/ ACCION DEL FLUOR EN LA DESMINERALIZACION

La caries puede definirse como la pérdida por disolución de la estructura mineral que compone el diente. Esta disolución se incrementa notablemente al disminuir el pH del medio siguiendo la fórmula (10):



La sustancia que hoy por hoy más ha mostrado poseer la facultad de proteger la pieza dental ante la desmineralización es el flúor; veamos pues por qué mecanismos se produce este aumento en la resistencia a la pérdida de material mineral. Para ello, tal vez lo mejor sea analizar en un inicio la composición del esmalte dental y como éste interactúa con los fluidos bucales.

Sabemos hoy que el esmalte está compuesto por materia inorgánica en una proporción aproximada del 95% siendo el calcio y los fosfatos los componentes más importantes. Estos se disponen en cristales de hidroxiapatita en los que los iones fosfato ocupan el centro de la unidad cristalina mientras que los iones calcio e hidroxilo quedan en la periferia. Evidentemente, ésta no es la única estructura que compone el esmalte. Así, y debido a la presencia de iones carbonato podemos encontrarnos cristales de carbonatoapatita. Volvamos sin embargo al estudio de la hidroxiapatita pues sobre ella se va a producir la acción del flúor que más nos interesa.

En efecto, al estar el esmalte en continuo intercambio con el medio circundante, todas las estructuras cristalinas son susceptibles de intercambiar iones con este medio. En concreto, y en el caso de la hidroxiapatita, ésta disposición de los iones hidroxilo en la superficie que hemos señalado, va a permitir, en ocasiones, su sustitución por iones flúor presentes en los líquidos circundantes dando lugar a cristales de fluorapatita o fluorhidroxiapatita. Estos nuevos cristales formados, según diferentes estudios están compuestos por unidades cristalinas de menor tamaño como consecuencia de la mayor atracción que ejercen los iones de flúor sobre los de calcio respecto de la que ejercían los iones hidroxilo (11).

Todo ello resulta en una mayor estabilidad y calidad de las nuevas estructuras cristalinas formadas.

Podemos ya empezar a entender como el flúor va a disminuir la desmineralización en razón de lo expuesto hasta aquí. En efecto, si bien es cierto que la disolución de sustancias minerales que componen el diente depende en gran parte de las características del medio que rodea a éste (composición, pH ...), no lo es menos que el grado de disolución también va a depender de la propia estructura y organización de la materia inorgánica del diente y ya hemos visto como ésta en presencia de flúor se ve modificada resultando en una mayor estabilidad.

No debe pues extrañarnos el que, mientras que el pH crítico, aquel por debajo del cual se inicia la disolución de los cristales, de la hidroxiapatita sea de 5,2-5,5, el de la fluorapatita sea de 4,5 lo cual ilustra bien a las claras los beneficios del flúor respecto de la resistencia a la desmineralización.

A.2/ ACCION DEL FLUOR EN LA REMINERALIZACION

A la luz de lo expuesto anteriormente, cabe preguntarse qué es lo que sucede cuando se alcanzan estos pH que hemos citado y se produce la disolución de la estructura cristalina, ¿va a ser capaz el flúor, ya sea el presente en los fluidos orales o el incluido en la estructura dentaria, de favorecer una remineralización que detenga el proceso carioso?

La respuesta a esta pregunta está adquiriendo en los últimos años cada vez tintes más afirmativos según diferentes estudios e incluso se está aceptando como uno de los mecanismos esenciales por los que el flúor disminuiría la incidencia de caries. En concreto, este mecanismo sería el que en mayor medida justificaría el tratamiento de lesiones incipientes de caries localizadas en esmalte con flúor (12). Estas zonas desmineralizadas así tratadas podrían llegar a suponer verdaderos reservorios de este ion.

Esta remineralización según Silverstone (13) supone una disminución en el tamaño de la lesión y , lo que resulta más interesante, una mayor resistencia a la recidiva.

Además, para que esta remineralización se produzca, no es necesario el aporte de dosis importantes de flúor pues diferentes estudios han mostrado que aportes frecuentes de dosis relativamente bajas de flúor producían mayores efectos que dosis masivas pero más espaciadas en el tiempo.

En cuanto al mecanismo por el que se produciría esta remineralización, se explica por la mayor captación de flúor que se produce en aquellas zonas de esmalte lesionado respecto de áreas vecinas sanas con la ventaja añadida de que como hemos señalado, este acúmulo de flúor a este nivel favorecerá nuevas remineralizaciones ante posteriores ataques ácidos y la liberación de iones fosfato y calcio que éstos suponen. Todo ello permite afirmar a Silverstone que "paradójicamente, el desarrollo de una pequeña lesión subclínica del esmalte más externo permite detener su desarrollo".

A.3/ ACCION DEL FLUOR EN LA PLACA BACTERIANA

La hipótesis de que uno de los mecanismos por los que el flúor disminuiría la incidencia de caries como consecuencia de una supuesta disminución de la producción de ácidos por la placa se planteó a lo largo de muchos años basándose en su reconocida capacidad inhibitoria de la actividad bacteriana. Sin embargo, puede afirmarse que no fue hasta finales de los años 50 que esta hipótesis empezó a adquirir una base científica y ello como resultado esencialmente de dos estudios en los que se demostraba como efectivamente las bacterias son sensibles al flúor, sobre todo cuando desciende el pH, y que la concentración de flúor es 100 veces superior en placa que en saliva contrariamente a lo que sugerían estudios anteriores (14). Esta captación de flúor por parte de la placa se efectuaría a partir no sólo del flúor presente en saliva o del proveniente de eventuales aplicaciones tópicas sino también a partir del proveniente de los fluidos gingivales y ello, en una medida no despreciable. En efecto, se ha demostrado en animales de experimentación que 30 minutos después de inyectarse una dosis de flúor, la concentración de dicho elemento en los fluidos gingivales es idéntica a la determinada en plasma, hecho que no sucede con la concentración hallada en saliva.

En lo referente al modo por el que el flúor quedaría incorporado a la placa, se sugirieron diferentes teorías. Así se pensó en las proteínas y polisacáridos de la matriz como posibles responsables de esta incorporación. Igualmente, se pensó en los iones calcio y fosfato pero la teoría que hoy se acepta es la que asigna a la propia bacteria la principal responsabilidad en la captación del flúor.

Así diferentes estudios muestran que la concentración intracelular de flúor es notablemente superior a la del medio sobre todo si se trata de un medio ácido. Asimismo, se ha demostrado la presencia de flúor en por lo menos, once elementos citoplasmáticos. De entre ellos, particularmente significativo es el caso del enzima enolasa en el que los niveles de flúor detectados diferían según la bacteria analizada y en concreto a su susceptibilidad al flúor.

En lo referente al mecanismo por el que el flúor penetraría en la célula, la diferencia entre el pH intracelular y el del medio (0,6 en medio neutro y 0,9 cuando el pH externo es de 5,0, siendo siempre superior el pH intracelular) jugaría un papel importante al permitir que los iones libres de F^- a los que la célula no es permeable, se combinen con iones H^+ de manera a crear moléculas no ionizadas de HF a los que sí se muestra permeable la célula. Ello nos permite comprender mejor porque la sensibilidad bacteriana al flúor es mayor cuando descende el pH del medio. Pero sigamos analizando el trayecto de esta molécula de HF. Al penetrar en la célula por difusión, se encuentra con un pH que, como ya hemos visto, es mayor que el del medio del que provenía circunstancia que va a determinar una disociación de la molécula en iones libres. Todo ello determina tres consecuencias: se mantiene la diferencia de concentración de HF respecto del medio extracelular con lo que la entrada por difusión de nuevas moléculas se mantiene; el aumento de H^+ determina una variación del pH intracelular que puede alterar su correcto funcionamiento enzimático y por tanto entre otras circunstancias puede disminuir su producción de ácidos y finalmente, se determina un aumento en la concentración de flúor libre en el medio citoplasmático en el que podrá ejercer sus diferentes acciones.

En definitiva, podemos decir que la entrada de flúor en la célula está controlada esencialmente por su diferencia de concentración en los medios extra e intracelulares y por la diferencia de pH en estos dos mismos medios.

Pero veamos ya cuales serían las acciones de el flúor una vez se halla en el interior de la célula.

- ACCION ANTICARIOGENICA DEL FLUOR INTRACELULAR:

Ya hemos visto anteriormente como uno de los elementos citoplasmáticos más susceptibles al flúor era el enzima enolasa. Ello, tiene importantes consecuencias. En efecto, este enzima es responsable de la síntesis del ácido fosfoenol pirúvico, precursor del ácido láctico, a partir de ácido fosfoglicérico; así pues, la inhibición del enzima por parte del flúor va a determinar:

- Menor entrada de glucosa en la célula pues numerosas bacterias requieren para su entrada la presencia del ácido fosfoenolpirúvico.

- La entrada de glucosa también va a ser menor en aquellas bacterias en las que para que ésta se produzca se requiere una expulsión previa de protones pues los enzimas responsables de ello también se han mostrado sensibles al flúor.

- Evidentemente esta doble acción en la incorporación de glucosa en la célula va a determinar una menor capacidad para sintetizar glucógeno con lo que la posibilidad para la bacteria de producir ácidos en los períodos en los que no se produce un aporte de glucosa se verá notablemente reducida.

- Por último, la cariogenicidad de la bacteria será obviamente mucho menor si como hemos dicho, se ve disminuida la síntesis de los precursores del ácido láctico.

A.4/ OTRAS HIPOTESIS PARA LA ACCION PROTECTORA DEL FLUOR

Si bien es cierto que las hipótesis anteriormente presentadas son las más generalmente aceptadas para explicar la acción anticariogénica del flúor, no es menos cierto que otras posibles teorías que se han apuntado en los últimos años pueden ayudarnos a comprender mejor la naturaleza de esta acción y a abrir nuevas líneas de investigación.

Un buen ejemplo a este respecto lo constituyen las teorías presentadas ya en los años 50 según las cuales el flúor administrado durante la época de desarrollo dentario actuaría modificando la morfología dentaria. Así, las piezas dentarias se caracterizarían por unas cúspides más redondeadas y unos surcos de menor profundidad configurando en definitiva una anatomía que facilitaría la autoclisis y por tanto disminuiría la susceptibilidad a la caries (15).

Otra posibilidad que se ha sugerido en los últimos años parte de la reconocida capacidad del flúor para favorecer la proliferación de células óseas y aumentar la mineralización de hueso embrionario (Farley, Wergerdal y Baylink, 1983).

Ello sugirió a Kortelainen y Larmas (16) la posibilidad de que el flúor afectase a la actividad odontoblástica y por consiguiente a la mineralización de la dentina. Para verificar esta posibilidad midieron el desarrollo de lesiones cariosas en esmalte y dentina así como las características de la dentina tras la administración de diferentes dosis de flúor en el agua de bebida de ratas sometidas a condiciones cariogénicas demostrándose finalmente que sólo con dosis elevadas de flúor parece confirmarse la alteración de la actividad odontoblástica lo cual se traduciría en un mayor depósito de dentina secundaria. Estas dosis, 19 partes/10⁶, serían del orden de las empleadas en el tratamiento de la osteoporosis en humanos por su capacidad de inducir la formación ósea (Schulz et al., 1986).

Teniendo en cuenta las diferentes acciones del flúor y su repercusión en la susceptibilidad dental a la caries parece adecuado el calificarlo como un elemento multifactorial en su mecanismo de acción. En efecto, si bien su efecto en la solubilidad del esmalte y en la capacidad de favorecer la remineralización parecen ser los de mayor peso específico, no por ello debe olvidarse el resto del amplio abanico de posibilidades que se han sugerido hasta el momento y debe profundizarse en su comprensión y en el estudio de sus aplicaciones terapéuticas.

B/ FLUOR TOPICO

Desde hace aproximadamente 50 años se viene promulgando la aplicación de flúor de manera tópica en la prevención de la caries. Ello no debe extrañarnos tras haber visto en el capítulo anterior cuales son los mecanismos por los que el flúor aumentaría la resistencia de las piezas dentales al ataque carioso ya que en la mayoría de ellos se adivina la importancia que adquiere la presencia continua del flúor en el medio oral. Así, diferentes son los estudios realizados en animales de experimentación que demuestran la utilidad del flúor tópico.

Uno de ellos se diseñó con el objetivo de comprobar si la administración de manera tópica y sistémica como supone la incorporación del flúor en el agua de bebida se veía acompañada de un aumento de los niveles de flúor en el esmalte, las conclusiones ciertamente no eran las que se podrían esperar en un primer momento.

En efecto, Larson y sus colaboradores (17) demostraron como, si bien en aquellos casos en que la administración de flúor en el agua de bebida en edades tempranas y antes de la exposición a condiciones cariogénicas sí se veía acompañada de un aumento proporcional de la concentración de flúor en esmalte, la administración de flúor en edades posteriores no se correspondía con un aumento de sus niveles en la superficie adamantina.

Ahora bien, este no aumento de los niveles de flúor en el esmalte no significaba "paradójicamente" que el flúor así administrado en el agua de bebida no ofreciese protección.

En efecto, la incidencia de caries en este grupo de ratas fue significativamente menor que en el grupo al que sólo se les administró en los días previos al inicio de las condiciones cariogénicas; grupo que por otro lado, también es cierto que presentaba menos lesiones que el grupo control al que no se administró el agente protector en ningún momento.

Todo ello venía a confirmar diferentes aspectos ya anunciados por estudios precedentes y que permiten destacar los efectos protectores del flúor y como éstos no son de naturaleza única. Así, se demuestra la mayor capacidad de las piezas recién erupcionadas para incorporar el flúor presente en el medio oral, pero también se confirma la importancia del flúor presente en los fluidos orales aún en concentraciones bajas para proteger las piezas de la caries a pesar de que no se incorpore en su esmalte. La naturaleza de la protección aportada en cada caso no es la misma como lo demuestra la diferente incidencia de caries y el hecho de que cuando el flúor es administrado por vía sistémica disminuyan sobre todo las caries de surcos mientras que si se emplea flúor tópico, son las superficies lisas las protegidas en mayor medida.

Con el objetivo de demostrar la mayor efectividad del flúor tópico respecto del sistémico, Mirth y sus colaboradores realizaron un estudio sobre tres grupos de roedores: al primero se le aplicó un dispositivo intraoral de liberación de flúor, al segundo se le administraba flúor vía sistémica en una concentración similar a la que también era presente en los fluidos corporales del primer grupo circunstancia que se verificaba comprobando los niveles de flúor en la orina de ambos grupos. Por último, al tercer grupo se le proporcionaba flúor en el agua de bebida en una concentración de 10 ppm.

Una vez analizada la incidencia de caries en los tres grupos, se observó que tan sólo en las ratas en las que el flúor era administrado por vía sistémica no se producía una disminución en la incidencia de la enfermedad lo cual venía a confirmar la importancia del flúor tópico. El hecho de que en estudios precedentes el flúor sistémico sí se mostrase efectivo probablemente es debido a que en ellos se administraba mediante una sola dosis por día lo cual ocasionaba un pico de concentración en suero y saliva que sí se mostraba eficaz mientras que en el presente estudio se utilizaba un dispositivo subcutáneo de liberación continua por lo que no se producía el citado pico (18).

En cualquier caso, estos estudios confirman la importancia de la presencia del flúor en el medio oral de manera a asegurar unos niveles en saliva de 1,5 ppm. que se han mostrado tanto in vitro como in vivo capaces de aumentar la remineralización (Silverstone 1977) y de ocasionar una concentración de flúor en la placa notablemente superior suficiente como para constituir un reservorio que interfiera con la disolución del esmalte (Fejerskov 1981, Pearce 1984).

C/ FLUOR LIPOSOMADO

C.1/ INTRODUCCION

Para intentar alcanzar estos niveles de flúor en saliva y conseguir mantenerlos el máximo tiempo posible, hemos pensado ensayar una nueva forma de presentación del flúor como es la resultante de su incorporación en estructuras de naturaleza liposomal. Para comprender mejor la naturaleza de esta decisión, tal vez lo mejor sea analizar las características de estas estructuras y los fines terapéuticos con que han sido utilizadas desde 1961, fecha en la que Bangham creó a partir de fosfolípidos dispersos en un medio acuoso unas vesículas microscópicas constituidas por una o varias membranas lipídicas dobles que englobaban uno o varios compartimentos acuosos y que desde entonces se conocen con el nombre de liposomas.

Así, en un inicio, su principal interés radicó en su utilización como modelos celulares como consecuencia de la similitud entre la membrana bilipídica de los liposomas con la membrana celular. Precisamente como resultado de esta similitud, no se tardó mucho tiempo en intuir las diferentes ventajas que podía suponer la utilización de estas estructuras como instrumento de vehiculización de fármacos. Pasamos pues a presentar algunas de estas posibilidades que cabe esperar del empleo de los liposomas como forma galénica:

1/ Los liposomas pueden constituir una estructura que evite una degradación prematura del principio activo.

2/ Ya sea como consecuencia de sus propiedades físicoquímicas o de su marcaje con determinados antígenos, los liposomas pueden constituir auténticos vectores de manera a vehiculizar el principio activo hacia los tejidos realmente patológicos.

Gracias a estas dos ventajas, se consigue disminuir de manera notable la posible toxicidad del principio activo y sus efectos secundarios ya que se pueden alcanzar los mismos efectos que se conseguirían con el medicamento en su forma libre pero con una menor dosis a la vez que se evita en gran medida su actuación sobre células sanas. Pero pasemos sin mayor dilación a presentar con mayor detenimiento la composición de estas estructuras.

C.2/ CLASIFICACION Y COMPOSICION

Los liposomas pueden diferenciarse tanto por su tamaño como por la estructura de la membrana que los constituye. Así, siguiendo estos criterios podemos distinguir tres tipos de liposomas (19).

- **Los liposomas o vesículas multilamelares (MLV)** formados por varias bicapas y varios compartimentos acuosos concéntricos.

Tienen un tamaño de 400-3500 nm y un volumen encapsulado de 4,1 microlitros por miligramo de lípido.

- **Los liposomas o vesículas unilamelares grandes (LUV)** que constan de una bicapa y un compartimento interno.

Su diámetro es de entre 200 y 10000 nm y su volumen de encapsulación es de 13,7 microlitros por miligramo de lípido.

- **Los liposomas o vesículas unilamelares pequeña (SUV)** por su parte, son semejantes a los anteriores pero su diámetro es de 20 a 50 nm y su volumen de encapsulación es de 0,5 microlitros por miligramo de lípido.

Se considera sin embargo, que esta clasificación resulta incompleta pues al parecer el margen de diámetro más importante es el comprendido entre los 50 y los 240 nm.

Sea cual sea el tipo de liposoma seleccionado, para su preparación se suelen utilizar diferentes fosfolípidos que podemos clasificar en naturales y en sintéticos. Así, dentro de los naturales se suelen emplear fosfatidilcolinas de yema de huevo o de soja mientras que dentro de los sintéticos los más empleados son las dimiristoil, dipalmitoil o diesteroilfosfatidilcolinas. Igualmente se pueden utilizar otros fosfolípidos como esfingomielinas. Por último, para otorgar al liposoma una carga neta superficial se le pueden añadir otros fosfolípidos ya sean aniónicos o catiónicos.

Otros elementos que pueden incorporarse son glucolípidos, ácidos o bases orgánicos y hasta macromoléculas como proteínas de membrana o polímeros artificiales.

Merece especial atención la incorporación de colesterol pues ésta, que puede efectuarse hasta una concentración molar del 50 por 100, modifica notablemente las características de la membrana del liposoma. Así, su incorporación aumenta la compacidad de la pared, reduce la permeabilidad de la membrana si está en estado fluido y aumenta la temperatura de transición de fase, considerando esta última como aquella en que la membrana pasa de estado gel a fluido (20).

C.3/ INCLUSION DE MEDICAMENTOS Y APLICACIONES TERAPEUTICAS

El principal aspecto a valorar a la hora de describir el modo de incorporación de un principio activo en una estructura liposomal es su grado de hidrofilia. En efecto, va a ser en función de éste que se va a añadir el principio activo en un momento u otro de las diferentes etapas que constituyen cada uno de los métodos descritos para la preparación de liposomas.

Igualmente, la naturaleza de la interacción entre las estructuras del liposoma y el principio activo va a variar en función del grado de hidrofilia de este último. Así, si éste es de naturaleza lipofílica, quedará incorporado en la membrana bilipídica del liposoma mientras que si es de naturaleza hidrofílica o anfifílica, se incorporará a su compartimento acuoso.

No ha sido hasta los últimos años sin embargo, que se ha llegado a la plena explotación comercial de los liposomas y ello esencialmente como consecuencia de dos grandes problemas que se planteaban: conseguir evitar la inestabilidad que con frecuencia presentaban y alcanzar una correcta homogeneidad del preparado.

La inestabilidad en concreto, podía ser debida a la autooxidación de los fosfolípidos como resultado de los mecanismos habituales de peroxidación lipídica, a una posible agregación y por último, a la fuga del principio activo. Para solucionar estos problemas se ha recurrido respectivamente a la incorporación a la membrana de agentes quelantes u oxidantes, de fosfolípidos aniónicos o catiónicos y finalmente, de colesterol.

Por ello, en la actualidad existen diferentes protocolos de preparación de liposomas en función del principio activo que se desea incorporar y de la estructura liposomal buscada asegurándose en cualquier caso la homogeneidad y estabilidad del preparado finalmente obtenido lo cual ha permitido desarrollar diferentes aplicaciones terapéuticas alcanzándose con frecuencia notables éxitos.

Un buen ejemplo a este respecto lo constituye el tratamiento mediante antimoniales incorporados a liposomas de la leishmaniosis, enfermedad parasitaria que afecta a 100 millones de personas anualmente en todo el mundo. En efecto, su tratamiento con antimoniales, sustancias afines al arsénico, en su forma libre comporta grandes riesgos pues pueden verse afectados diferentes tejidos como el cardíaco, el hepático y el renal esencialmente. Sin embargo, se ha demostrado que con su inclusión en vesículas liposomales, se puede disminuir drásticamente la dosis necesaria ya que su eficacia se ve aumentada hasta 700 veces como resultado de la facilidad de captación de los liposomas por las células del sistema retículoendotelial (macrófagos y otras células altamente fagocitarias esparcidas por nódulos linfáticos, hígado, bazo, médula ósea y pulmones y que circulan por la sangre y linfa) (21). Ahora bien, los liposomas no sólo se han revelado útiles en el tratamiento de enfermedades del sistema retículoendotelial sino que se ha visto que también incrementan la eficacia y reducen la toxicidad de medicamentos administrados contra afecciones tan diversas como la pielonefritis e infecciones fúngicas sistémicas. Igualmente, se han mostrado útiles en el tratamiento con doxorubicina de diferentes tumores malignos macizos y leucemias disminuyendo las lesiones cardíacas que comporta su utilización en forma libre.

Asimismo, en los últimos años se han venido desarrollando diferentes estudios con el objetivo de hacer de los liposomas auténticos vehículos de obtención de vacunas aprovechando la facultad de intensificación de la respuesta inmunitaria ante antígenos pequeños que se les ha demostrado.

D/ USO DE SOLUCIONES CALCICAS PARA AUMENTAR LA CAPTACION DE FLUOR POR EL ESMALTE

D.1/ INTRODUCCION

Tanto en humanos como en animales de experimentación están ampliamente documentadas las diferencias de concentración de flúor que se producen en la superficie de las piezas dentales. Así, en el caso concreto de las ratas, Weatherel y cols. (22) demostraron como tras realizarse diferentes aplicaciones de flúor tópico, los niveles de flúor en el esmalte eran sensiblemente inferiores en el tercio gingival de las superficies libres como resultado de estar cubiertas por encía. Lo mismo sucedía en las superficies interproximales y en las paredes de los surcos. Por ello, se vienen testando diferentes métodos que acrecentasen la acción anticariogénica del flúor a este nivel evitando así un aumento excesivo en la dosis aportada o en el tiempo de duración del tratamiento. Un buen ejemplo a este respecto lo constituyen los preparados a base de soluciones cálcicas que pretenden aumentar la captación de flúor por parte del esmalte.

Así, ya en 1975 Chow et al. (23) demostró con éxito como *in vitro* la captación de flúor por el esmalte era efectivamente mayor cuando la superficie dental era sometida a un pretratamiento a base de una solución ácida de fosfato de calcio. Los niveles de fluorapatita registrados aumentaban así de manera notoria, circunstancia que se confirmó en estudios posteriores efectuados en ratas y en seres humanos.

Con el mismo objetivo, se han utilizados preparados a base de glicerofosfato de calcio demostrándose también aquí un aumento en la captación de flúor cuando se combina su administración con la de preparados de monofluorofosfato (24)

D.2/ MECANISMO DE ACCION

El mecanismo por el que se produciría un aumento en la captación de flúor por parte del esmalte sometido a una solución ácida de fosfato de calcio sería la aparición de una superficie de fosfato dicálcico dihidratado que vendría a reaccionar rápidamente con el flúor facilitándose así la formación de fluorapatita (23).

En lo que concierne a la cuantificación del aumento en la captación de flúor por el esmalte superficial tras la aplicación de estos tratamientos combinados a base de soluciones cálcicas y flúor, cabe calificarla de notable.

Así, un estudio realizado en ratas, mostraba una concentración final de flúor en el esmalte superficial dos veces superior en aquellos animales en los que se combinaban las dos soluciones respecto de la concentración hallada en los animales a los que tan sólo se les proporcionaba la solución de flúor y diez veces superior a los niveles registrados en el grupo control (25).

Rölla y Saxegaard por su parte (26) proponen un pretratamiento de la superficie dental con calcio como uno de los mecanismos para favorecer el depósito de fluoruro cálcico tras la administración de flúor tópico. Otros métodos para conseguir este mismo objetivo serían el incremento del tiempo de reacción entre el flúor y el esmalte, la reducción del pH de la solución o el aumento de la concentración de flúor en el agente tópico. En efecto, desde hace ya cuatro décadas, se sabe que el fluoruro cálcico es el producto que se deposita en mayor medida sobre la superficie del diente tras la exposición de ésta a altas concentraciones de flúor tópico. Su estabilidad vendría dada fundamentalmente por la adsorción de iones fosfato en su superficie.

En cualquier caso, este aumento del depósito de fluoruro cálcico supondría un gran beneficio en la protección de la superficie del diente ante el ataque cariogénico pues constituye un reservorio para la liberación lenta de iones de flúor cuando sucede este ataque y se ve disminuido el pH. Estos iones de flúor así liberados serían susceptibles posteriormente de incorporarse a la hidroxiapatita a través de reacciones de disolución y reprecipitación.

Por tanto, y a diferencia de lo que se creía anteriormente cuando McCann en 1968 afirmó que debido a la mayor solubilidad del fluoruro cálcico frente a la fluorhidroxiapatita su formación debía limitarse, en la actualidad ésta se tiende a favorecer y como hemos visto, el pretratamiento a base de calcio de la superficie dental es un buen medio para ello.

Por otro lado, hay que destacar que la reducción en el número de caries que comporta la combinación de estas soluciones cálcicas con aplicaciones de flúor es particularmente significativa en aquellas superficies como las oclusales en que como hemos señalado anteriormente, la acción del flúor tópico aplicado individualmente es menos efectiva.

Sin embargo, se busca la manera de potenciar todavía más esta circunstancia. Para ello, se ha propuesto incluir estas soluciones en preparados con detergentes o etanol de manera a facilitar su acceso a las áreas en que éste se presenta más difícil.

Con el mismo objetivo, se ha sugerido su incorporación a preparados de mayor viscosidad obtenidos por ejemplo a partir de derivados de la celulosa con lo que se aumenta el tiempo de retención a la vez que se aísla la solución de diferentes componentes de los fluidos orales que podrían degradarla.

Es con estos mismos objetivos, que en el presente protocolo experimental hemos procedido a la incorporación de la solución cálcica en estructuras liposomales.

IV/ RATA Y CARIES.

IV.1/ INTRODUCCION

Diferentes especies de animales se han mostrado útiles como modelos experimentales para el estudio de la caries al presentar notables similitudes con el ser humano tanto en lo que se refiere a la etiología como a la patocronia de la enfermedad. Es el caso por ejemplo de la rata ya que desarrolla lesiones extensas en periodos cortos de tiempo y sin que haya una acumulación de placa apreciable.

Sin embargo, es evidente que sólo con la elaboración de un correcto diseño experimental las conclusiones extraídas de estos estudios resultarán válidas y útiles para la comprensión de la enfermedad en el ser humano. Para ello, consideramos imprescindible el analizar las diferentes características del animal escogido ya sean salivales, dentales o de otra índole de manera a poder valorar con mayor objetividad los diferentes protocolos experimentales existentes.

IV.2/ CARACTERISTICAS DENTALES DE LA RATA:

Las ratas se definen como animales monofiodontos es decir que disponen de una única dentición que sigue la siguiente fórmula dentaria: $I^{1/1}$, $M_1^{1/1}$, $M_2^{1/1}$, $M_3^{1/1}$.

Los incisivos erupcionan de forma continua y como característica, sólo están cubiertos de esmalte en su superficie labial mientras que en la lingual están cubiertos por cemento y dentina. El esmalte presenta en los incisivos un aspecto amarillo como consecuencia de la presencia de un pigmento que contiene hierro. Esta coloración va aumentando con la edad a partir del día 26 después del nacimiento. Estos incisivos experimentan un rápido crecimiento de manera que cada 40-50 días se renuevan totalmente manteniéndose al igual que en el resto de los roedores con unas dimensiones constantes merced a una atrición continua de sus márgenes incisales. Suelen erupcionar en la cavidad oral hacia el sexto u octavo día de vida.

Respecto del interés de estas piezas en el estudio de la caries, cabe decir que es mínimo pues al ser dientes de erupción continua, no son susceptibles a esta enfermedad.

Su interés se centra más bien en su gran utilidad como marcadores biológicos de los diferentes acontecimientos que hayan podido tener lugar durante su desarrollo y que suelen quedar registrados como líneas de crecimiento alteradas.

El primer y segundo molar por su parte inician su desarrollo más o menos de manera paralela hacia el catorceavo día después de la concepción. En cuanto a la fecha de erupción, esta varía según las especies.

Así, en la rata albina y en las derivadas de la Sprague Dawley, los primeros molares suelen hacerlo hacia el día 16 de vida mientras que los segundos molares lo hacen uno o dos días después de manera que hacia el día 20 de vida, los cuatro molares ya han erupcionado cuando las ratas han sido separadas de la madre. En lo que concierne a los terceros molares, éstos erupcionan hacia el día 33 de vida haciéndolo un día antes el mandibular.

Evidentemente, estas fechas de erupción pueden variarse mediante manipulaciones nutricionales y como ya hemos dicho, en otras especies serán diferentes. Todas estas características diferenciales en la formación y erupción de las piezas lejos de ser un inconveniente van a sernos de gran utilidad en la elaboración de diferentes diseños experimentales. Así, los dos primeros molares se diferencian del tercero en que se mineralizan de forma activa mientras la rata está todavía amamantando mientras que el tercero lo hace cuando la rata ya está sometida a la dieta y bebida experimentales. Por tanto, podemos decir que las modificaciones introducidas en la dieta por el experimentador van a tener una repercusión sistémica en el tercer molar mientras que en los dos primeros molares van a tener una acción local como resultado del estímulo de la placa bacteriana por los residuos alimentarios.

En lo referente a la anatomía de los molares, éstos son de dimensiones pequeñas de manera que los tres molares de un cuadrante pesan aproximadamente 40 mg. Presentan una fisuras profundas y estrechas que se extienden en dirección bucolingual en un número de tres para el primer molar y de dos y una para el segundo y tercer molares respectivamente como podemos apreciar en las fotografías de la página 55. Estos molares presentan una fina capa de esmalte de como máximo 0,1 mm. que no cubre las puntas de las cúspides.

Igualmente, poseen unas áreas hipomineralizadas en la superficie bucal y en la base y lados de las fisuras que son particularmente importantes en el proceso de mineralización posteruptiva.

- Fotografías página siguiente:

. Fotografía n° 1: Vista oclusal de una mandíbula de rata con los tejidos blandos eliminados y en la que podemos apreciar claramente los seis molares.

. Fotografía n° 2: Vista oclusal a mayor aumento de los tres molares de la hemimandíbula izquierda de la fotografía anterior en la que podemos distinguir claramente el número de surcos de cada molar así como el extremo hipomineralizado de cada cúspide.



. Fotografía nº 1.



. Fotografía nº 2.

IV.3/ DISEÑO DE UN ESTUDIO EXPERIMENTAL DE CARIES EN LA RATA:

El objetivo de este capítulo consiste en analizar como podemos variar los factores que hemos visto que intervienen en la patogénesis de la caries (huésped, dieta, factor bacteriano y tiempo) con el fin de diseñar un estudio experimental de caries que resulte viable y que ofrezca unos resultados significativos. El primer factor que vamos a analizar es el factor huésped, pasamos pues a presentar las diferentes especies de ratas que han sido utilizadas en estudios de esta índole así como algunas condiciones de experimentación que deben respetarse.

A/ CONDICIONES DE EXPERIMENTACION EN UN ESTUDIO DE CARIES EN LA RATA:

Diferentes especies de ratas han sido utilizadas en estudios experimentales de caries. Así, podemos destacar las ratas negras NIH, las Sprague- Dawley NIH, las Osborne- Mendel, las Charles River COBS o las ratas Wistar.

La selección de este animal y no otro obedece a diferentes motivos entre los que podemos destacar su relativo fácil manejo, el hecho de que sea un animal robusto que aprende rápidamente a procurarse alimento y agua y que se presta fácilmente a las demás condiciones experimentales sin olvidar evidentemente el factor fundamental como es la coincidencia con el ser humano en los factores involucrados en el desarrollo de la enfermedad.

Diferentes protocolos han sido elaborados para el estudio de la caries en la rata entre los que destacamos aquellos que podríamos denominar convencionales, los de supresión de la flora o gnotobióticos y los que controlan la alimentación de la rata.

En los primeros o convencionales, se aloja a los animales sin intención de controlar su posible contaminación bacteriana ni su consumo de agua o alimentos pudiéndose favorecer o no la superinfección con microorganismos cariogénicos

Tenemos luego los protocolos de gnotobiosis relativa o control de la flora en los que mediante la administración de antibióticos se selecciona el tipo de flora a lo largo del período experimental ya que por un lado se infecta a los animales con microorganismos resistentes al antibiótico proporcionado, y por otro se intenta evitar a lo largo del estudio la posible contaminación por otros microorganismos utilizando equipamientos especiales. Así, se suelen utilizar animales obtenidos en partos por cesárea con aislamiento de plásticos estériles para entonces inocularles uno o más microorganismos conocidos inténtandose evitar a lo largo del estudio la infección por otros microorganismos con el uso de filtros de aire y demás atenciones requeridas para mantener la esterilidad del ambiente.

Por último, existen los protocolos que establecen un estricto control del consumo de agua y alimento por parte del animal que por lo demás es mantenido en condiciones convencionales de experimentación.

Veremos más tarde que criterios se suelen seguir a la hora de seleccionar el momento en que debe incorporarse el animal al estudio y cual debe ser la duración de este último, continuemos por el momento viendo algunas medidas seguidas en los diferentes estudios realizados hasta ahora.

Así, en lo que concierne al alojamiento de las ratas, éstas se suelen disponer en jaulas suspendidas o en jaulas de plástico siendo frecuentemente más útiles aquellas jaulas suspendidas sobre bandejas que contengan materiales que absorban los orines y las defecaciones del animal.

En este tipo de jaula se ha demostrado que la incidencia de caries es menor probablemente como resultado de la imposibilidad del reciclado de las defecaciones ya que no hay que olvidar que la rata es un animal coprófago característica que de hecho y como veremos más adelante, se ha utilizado como modo de vehiculización de microorganismos cariógenos en estudios experimentales.

Las jaulas deben ser etiquetadas de forma clara y distribuídas randomizadamente en las estanterías pues se ha demostrado que variables como la luz, la temperatura , los cambios de aire o la concentración de polvo que evidentemente varían en función de la localización dentro de la estantería, pueden alterar los resultados.

Con el fin de facilitar la comparación de los resultados entre diferentes estudios, sería conveniente facilitar a los animales agua destilada *ad libitum* y no agua de consumo público así como mantener el habitáculo dispuesto para el estudio a una temperatura constante de entre 20 y 25 °C y a una humedad de entre el 50 y el 55%.

Por el mismo motivo, debería proporcionarse iluminación artificial de manera que se garantizaran 12 horas diarias de iluminación y 12 horas de oscuridad.

Si se realiza el estudio con ratas recién nacidas, deben ser colocadas individualmente en cada jaula mientras que si se trabaja con ratas que ya han abandonado la lactancia materna se pueden distribuir de cuatro en cuatro. Se ha visto que en este último supuesto la variabilidad en la cuantificación de caries es menor que en animales alojados individualmente. En cualquier caso, los animales deben ser fácilmente identificables.

Para ello, un método efectivo y sencillo consiste en marcarles las orejas ya sea realizándoles unos pequeños orificios o tatuándoselas con un 22 Gauge con tinta de India. También se les puede tatuar la cola con tinta insoluble en agua.

B/ DURACION DEL ESTUDIO Y SEGUIMIENTO DEL ANIMAL:

Vamos a tratar en este apartado de analizar en qué momento de la vida del animal debe iniciarse el estudio y cuánto tiempo debería durar. Igualmente, señalaremos como ir valorando el estado de salud del animal y qué medidas deben seguirse para que éste sea el óptimo.

Se ha mostrado en diferentes estudios que cuanto antes se somete al animal a unas condiciones cariogénicas, mayor es la incidencia y la severidad de la caries.

Así por ejemplo, se prefiere forzar los animales a un abandono de la lactancia materna hacia el día 18 en vez del día 20 ó 21 de manera a introducir el consumo de dieta cariogénica en detrimento de la leche en un período que coincide con la erupción del primer y segundo molar y por tanto con una mayor susceptibilidad de estas piezas. Para conseguir este propósito se suele separar la camada de la madre manteniéndola junta unos nueve días con lo que la infección cruzada con el microorganismo cariogénico tenderá a causar una respuesta de caries uniforme.

En el mismo orden de ideas, diversos estudios han mostrado que una desalivación ocasionada en el animal antes de la erupción de las piezas producía unos efectos mucho más dramáticos que una desalivación posterior (27 y 28).

El número de cachorros por camada suele ser de 8 ó 9 siendo un número mayor de cachorros un factor negativo pues estas camadas tan numerosas acostumbran a integrar individuos con un bajo peso corporal y con una mayor vulnerabilidad a las enfermedades. Además, y en lo que se refiere a los estudios de caries, camadas tan numerosas pueden darnos resultados no significativos pues se ha demostrado que su susceptibilidad a la enfermedad es mayor, probablemente como resultado de su menor aportación en leche materna.

El período experimental por su parte puede ir desde 5 días hasta 50 días posteriores al abandono de la lactancia materna.

En 15 días suelen observarse ya lesiones en el área próximal, bucal y del surco y si el período es inferior a estas 2 semanas no se incluirá el tercer molar en él ya que no erupciona hasta los días comprendidos entre el 32 y el 34 en la mayoría de ratas.

Por el contrario en estudios de mayor duración sí se puede incluir el tercer molar pero existe el inconveniente de que las destrucciones suelen ser tan severas que se pierde la capacidad de evaluar la localización de la lesión inicial y se confunden lesiones de diferentes superficies. Por ello, se suelen preferir los protocolos de menor duración.

Una vez separadas de la madre, las ratas deberían pesarse semanalmente inspeccionando su crecimiento y desarrollo. Con esta medida se puede controlar individualmente cada rata de manera a identificar posibles signos de enfermedad o de toxicidad. Otros signos que nos pueden resultar útiles y que por tanto deberían valorarse son la actividad, el aspecto del pelo y el consumo de comida y agua; todos ellos son elementos que pueden ayudar al investigador a valorar la respuesta del animal a los diferentes tratamientos a que esté sometido. Por otro lado, se ha demostrado que este contacto frecuente con el animal para pesarlo y controlar el consumo de agua y comida tiene la ventaja añadida de hacer los animales más tratables y manejables.

C/ ELEMENTO BACTERIANO:

Ya en el año 1924 se aisló un microorganismo del grupo de los estreptococos en lesiones de caries en el ser humano otorgándosele desde ese momento el nombre de *streptococcus mutans* en razón de la variedad de formas que podían encontrarse en función del período de tiempo en que fuese incubado en el caldo de glucosa.

Una investigación posterior realizada en el año 1927 mostraba que en el 70 % de las lesiones cariosas investigadas se podía identificar este microorganismo. Posteriormente y ya en el año 1960 se consiguió provocar lesiones de caries en ratas de experimentación libres de gérmenes tras la infección a partir de una cepa aislada de *streptococcus mutans*. Hay que decir sin embargo que la identificación de estos microorganismos no resulta sencilla. Así, un método consistiría en examinar la morfología de una colonia con una magnificación de 50-100 aumentos pero aún así la identificación puede resultar complicada ya que la morfología de la colonia variará en función de parámetros como el tipo de dieta suministrado a las ratas o el tratamiento eventual con algún antibiótico. Por ello, con frecuencia se prefiere identificar estos microorganismo complementando el estudio de la morfología de la colonia con pruebas de fermentación de diferentes azúcares incluyendo el manitol y el sorbitol y verificando finalmente la producción de glucanos provenientes de la glucosa.

Por otro lado, es evidente que la cavidad oral no es un hábitat microbiano único sino que podemos identificar multitud de microorganismos en su interior. Así por ejemplo, nos encontraremos en la punta de la lengua con una flora microbiana diferente de la que hallaremos a pocos milímetros de distancia en zonas posteriores del dorso lingual o en las demás regiones anatómicas que podamos identificar en la cavidad oral.

Estas diferencias se deben por un lado a las condiciones ambientales en cada nivel y por otro al hecho de que aquellos microorganismos que colonicen en primer lugar un área impedirán la posterior implantación de determinadas colonias mientras que favorecerán la implantación de otras.

De entre las condiciones ambientales que intervendrán en la viabilidad de una colonia u otra en un determinado ámbito podemos destacar los restos de alimentos presentes en ella, el oxígeno disponible, la cantidad y composición de la saliva así como diferentes características anatómicas y estructurales del hábitat (presencia de surcos y fisuras o concentración de fosfato de calcio en el caso del esmalte por ejemplo). Otras condiciones ambientales que también cabe considerar son factores inmunológicos y el pH que dependería sobre todo de la cantidad y composición de la saliva y de la fermentación de los restos alimentarios por parte de los microorganismos.

No es ésta sin embargo la única dificultad con que nos encontramos al intentar identificar la flora microbiana en animales de experimentación. En efecto, existe la dificultad añadida de que aunque los animales nacen libres de microorganismos, a las pocas horas ya poseen una flora específica en su cavidad oral resultante de la contaminación por la saliva de la madre al limpiar a sus crías.

Existirán además otras contaminaciones posteriores por ejemplo por los microorganismos presentes en el pezón de la madre durante la lactancia o por los que anidan en la superficie de las estructuras incluídas en la jaula. Igualmente, podemos identificar en la boca de los roedores flora propia del pelo de los animales y del área genital así como coliformes como resultado de la práctica de la coprofagia.

La flora que a nosotros nos interesa sin embargo es aquella relacionada con las superficies de esmalte capaz de ocasionar lesiones de caries con la presencia de un sustrato rico en carbohidratos. Ya hemos visto que dentro de esta flora son los *streptococcus mutans* los que más nos interesan, veamos ahora que procedimientos se siguen para identificar una colonia de este microorganismo.

Lo más frecuente consiste en utilizar un medio de crecimiento consistente en una placa de agar *Mitis-salivarius* complementada con una solución de Tellurite-Chapman's hasta una concentración de 0,1% con lo que se consigue facilitar el crecimiento selectivo de estreptococos. Se consiguen así unas muestras que tras preparar las diluciones correspondientes se extienden en placas que se incuban en una atmósfera de 95% de N₂ y de 5% de CO₂ durante 18-24 horas a una temperatura de 37°C. Posteriormente se incuban aeróbicamente 24 horas más.

Finalmente, se aplicarán las medidas ya señaladas anteriormente de análisis de morfología y de fermentación de diferentes azúcares para completar la identificación de la colonia.

Al elaborar un protocolo de estudio de caries en animales de experimentación una decisión clave es la de seleccionar el momento de infección del animal con microorganismos cariogénicos. A este respecto, diferentes estudios muestran que el momento más adecuado es el que coincide con la erupción de las piezas y por tanto, en el caso de la rata con el abandono de la lactancia, mientras que si las condiciones cariogénicas tanto microbiológicas como alimentarias se aplican más tarde los resultados serán notablemente diferentes. Estas diferencias pueden explicarse por los cambios en la calidad estructural de la superficie del esmalte y en la morfología de la pieza, variaciones en la composición de la película adherida al esmalte o la colonización por otros microorganismos que podrían interferir con la implantación posterior de las colonias cariogénicas.

La hipótesis más aceptada sin embargo es aquella que considera la maduración del esmalte como la principal explicación de esta diferencia en la susceptibilidad a los microorganismos cariogénicos en función del momento de infección.

Si finalmente se opta por una infección temprana coincidente con la erupción de las piezas se desarrollarán rápidamente lesiones en todas las superficies. Así, tres días después, en el 23 si se inicia la experimentación en el 20, se observarán lesiones blancas en la superficie bucal y sólo dos días después ya se podrá ver una ruptura del esmalte.

En lo que concierne las maneras de infectar el animal de experimentación, se describen 5 tipos:

A/ Añadir colonias en el agua de bebida.

B/ Frotar los tejidos orales con una suspensión de células.

C/ Introducir las suspensiones de células o colonias con pipetas o jeringas en la cavidad oral.

El inconveniente de estos tres procedimientos es que al utilizar colonias de microorganismos específicos los resultados obtenidos están supeditados a las propiedades bioquímicas y fisiológicas del microorganismo. Así por ejemplo, si utilizamos un microorganismo capaz de formar dextrano a partir de glucosa y lo que queremos es valorar la cariogenicidad de la sucrosa, es evidente que los resultados que obtendremos no serán válidos.

A pesar de ello, estos procedimientos son los más útiles y los que proporcionan al experimentador un mayor conocimiento y control del microorganismo cariogénico. Los mejores resultados se obtienen como hemos visto repitiendo las inoculaciones durante tres o cuatro días coincidiendo con la erupción de las piezas es decir entre los días 17 y 20.

D/ Contaminar la cavidad oral con heces provenientes de animales infectados. Se obtienen gránulos fecales de un animal con lesiones activas de caries y se prepara una suspensión que se extenderá sobre las superficies dentales. Además algunos mililitros de la suspensión pueden añadirse al agua de bebida aunque entonces habrá que cambiar el agua de bebida diariamente. Habrá que repetir estas inoculaciones durante tres o cuatro días consecutivos.

E/ Enjaularlos con animales infectados correctamente. Este sistema aunque no tan efectivo también ha sido utilizado en diferentes estudios. El inconveniente de este sistema, al igual que el de todos aquellos que no proceden a una infección con una colonia determinada y correctamente identificada, es que no conoceremos la identidad precisa del microorganismo cariogénico.

Queremos señalar en este momento aunque resulte evidente, que al ser la caries una enfermedad multifactorial, el éxito del estudio no va a depender únicamente del microorganismo escogido o del momento de inoculación seleccionado sino que como ya hemos visto, tendremos que determinar también entre otros factores, la dieta utilizada y el momento en que la empezaremos a emplear así como la edad y la raza del animal con el que experimentaremos.

D/ DIETA CARIOGENICA:

Vamos a analizar en este apartado el siguiente factor relacionado con la incidencia de caries y como podemos intervenir sobre éste con el fin de establecer un correcto protocolo experimental.

Antes de pasar a describir las numerosas relaciones existentes entre el tipo de dieta y caries creemos útil el recordar que, cada vez que estemos introduciendo una modificación en la dieta, no sólo vamos a intervenir sobre el sustrato de la microflora como pueda ser en un inicio nuestra intención sino que evidentemente estaremos alterando en primer lugar el aporte nutricional del animal con el que estemos experimentando pudiendo esta última circunstancia variar igualmente la incidencia de caries.

En relación a esta influencia de la dieta en el huésped, podemos decir que ésta es la responsable del aporte de los nutrientes necesarios para el correcto desarrollo del animal ya sea de manera indirecta como sucede durante la gestación o el periodo de lactancia o directa tras la separación de la madre. No hay que olvidar que en la rata la formación de las piezas dentales sucede durante la gestación y la lactancia de ahí la importancia de una correcta alimentación de la madre durante estos periodos. Otra etapa crítica la constituye el período posteruptivo en que también serán importantes los requerimientos nutricionales por parte del animal.

Por otro lado, las propiedades organolépticas de gusto, olor y textura son características que también pueden intervenir en la cariogenicidad de una determinada dieta al ser susceptibles de modificar el patrón de comida y bebida del animal, circunstancias éstas, relacionadas con la incidencia de caries.

Así por ejemplo, si tenemos por un lado una dieta cariogénica y por otro hemos introducido en el agua de bebida una determinada concentración de flúor, es evidente que los resultados no serán ilustrativos si la dieta escogida llega a variar hasta tal medida los patrones de comida y bebida que no los hace representativos.

Asimismo, las características de la dieta en cuanto a textura y tamaño también deben valorarse ya que si en vez de utilizar una dieta seca y extremadamente fina como suele ser habitual, utilizamos una en la que se hayan añadido pequeñas cantidades de agua, la incidencia de caries será menor. Lo mismo sucede si preparamos una dieta en forma de gel, utilizando agar por ejemplo.

En lo que concierne a las características físicas de la dieta que deben valorarse, podemos citar el tamaño de las partículas pues determinará el que se impacten en mayor o menor medida en las fisuras y modificará su adhesividad y su solubilidad.

Por último, no deben olvidarse las propiedades bioquímicas de la dieta. Estas últimas intervendrán tanto en el huésped como en el otro elemento que hemos señalado al inicio de este apartado, la flora oral.

En el animal, como hemos visto, la dieta debe aportar los nutrientes necesarios a su correcto desarrollo pero además, las características bioquímicas de la dieta intervendrán también en otros fenómenos como puedan ser la maduración del esmalte o la formación de la película adquirida.

En cuanto a la flora oral, la dieta interviene evidentemente en primer lugar suministrando también a ella los nutrientes que requiere para su crecimiento y su actividad metabólica.

Por otro lado, también intervendrá indirectamente en relación a la flora al posibilitar o no el correcto estado de salud del animal y de sus tejidos orales determinando así una mayor o menor resistencia a la colonización bacteriana.

Volviendo sin embargo al efecto de la dieta en la selección de la flora y su crecimiento hay que decir que si bien es cierto que éste es muy importante en el período de erupción de las piezas dentales, es decir cuando se separa la camada de la madre, no es menos cierto que la dieta suministrada a la madre en el período de lactancia también ejerce una notable influencia al ser susceptible de alterar su flora oral y por tanto la de sus descendientes por contaminación durante los cuidados que les dedica.

Podemos decir en este caso, al igual que sucedía con la infección bacteriana, que cuanto antes sea sometido el animal a las condiciones cariogénicas, mayor será la incidencia de enfermedad y mayores serán las lesiones ocasionadas. Se recomienda por tanto la administración de dieta promotora de caries en el período de lactancia a la madre o si ello no es posible, cuando la camada es separada de su progenitora hacia los días 18-20 de vida.

Una vez analizadas las relaciones entre las características organolépticas, físicas y bioquímicas de la dieta y la cariogenicidad de ésta, pasamos a describir la composición de diferentes dietas consideradas como promotoras de caries.

1/ Stephan 580 (1951).

Leche descremada en polvo: 32% .

Sucrosa.....: 66% .

Extracto de hígado.....: 2% .

2/ Diet 2000 (Keyes 1959).

Harina de trigo integral...: 6 g.

Sucrosa.....: 56 g.

Leche descremada en polvo.: 28 g.

Levadura de cerveza.....: 4 g.

Extracto de hígado.....: 1 g.

Cloruro sódico ionizado....: 2 g.

3/ Diet 2700 (Shaw 1947).

Azúcar granulado.....: 67 g.

Caseína.....: 24 g.

Aceite de cereales.....: 5 g.

Celulosa.....: 15 g.

Extracto de hígado.....: 4 g.

Sal.....: 4 g.

Existe igualmente una variante de esta dieta (2700S) que contiene 25 g de sucrosa en vez de 67.

4/ Diet MIT 200 (Navia et al 1969).

Sucrosa pulverizada...: 67 g.

Lactoalbumina.....: 20 g.

Aceite de algodón.....: 3 g.

Celulosa.....: 6 g.

Vitaminas.....: 1 g.

Sal.....: 3 g.

Esta dieta puede ser reemplazada por otra que sustituye el 62% de azúcar por maíz manteniendo un 5% de azúcar (Diet MIT 305).

5/ Diet 301 (Larson 1963).

Sucrosa.....: 50 g.

Maíz.....: 23 g.

Caseína.....: 20 g.

Aceite de cereales...: 3 g.

Vitaminas.....: 2 g.

Sal.....: 2 g.

E/ METODOS DE SACRIFICIO Y DE PREPARACION DE LOS MOLARES:**E.1/ Métodos de sacrificio:**

Llegamos al momento en que una vez finalizado el período de experimentación los animales deben ser sacrificados. Existen diferentes métodos de sacrificio pero todos deben cumplir los siguientes requisitos:

- No deben comportar riesgo para el experimentador ni el resto de animales.

- No deben ocasionar dolor en el momento de la muerte.

- No deben tener efectos adversos con los objetivos del experimento.

Sea cual sea el método escogido, debería retirarse la comida de las jaulas la noche antes del sacrificio manteniéndose tan sólo la bebida, pero pasemos a ver cuales son los métodos de sacrificio más utilizados. Estos pueden dividirse según la naturaleza del agente utilizado que puede ser una sustancia inhalante, un fármaco inyectable o un método físico.

1/ Agentes inhalantes:

a/ Eter:

El dietiléter es un potente anestésico inhalador que puede ser utilizado para sacrificar pequeños animales como por ejemplo roedores. Se coloca un algodón o una gasa impregnada con el líquido anestésico en un compartimento cerrado de manera a generar una concentración letal de vapor y prevenir el contacto directo con el animal. Los inconvenientes de este procedimiento radican en que se trata de un material inflamable y altamente explosivo hasta el punto que los pulmones del animal pueden llegar a retener concentraciones peligrosas.

b/ Cloroformo:

Usado de manera similar al éter con la ventaja de ser menos explosivo.

c/ Dióxido de carbono:

Altas concentraciones de este gas (30%) tienen un potente efecto anestésico y se han utilizado como método de sacrificio de roedores pequeños.

2/ Fármacos administrados por vía parenteral:

Fármacos como el pentobarbital u otros relacionados con los barbitúricos administrados por vía endovenosa o intraperitoneal en dosis suficientes ocasionan una depresión del sistema nervioso central. Este método se utiliza preferentemente en animales de gran tamaño.

3/ Métodos físicos:

En ocasiones, el protocolo de experimentación requiere el proceder al sacrificio del animal por exsanguinación, dislocación cervical o decapitación previo sometimiento a sustancias anestésicas. Se evita así posibles alteraciones de resultados que podría comportar el uso de determinados compuestos utilizados en otros procedimientos de sacrificio.

E.2/ Preparación de los molares :

Una vez sacrificados los animales, se suelen conservar las cabezas o por lo menos los maxilares y éstos son sometidos a diferentes procedimientos según cual sea la técnica escogida para proceder a la cuantificación de las lesiones cariosas. Evidentemente estos pasos se realizan en aquellos procedimientos de recuento de caries en que se procede a la observación de las lesiones tras el sacrificio del animal pues existe también la posibilidad de examinar las lesiones *in vivo*.

Existen diferentes métodos para preparar las estructuras maxilares como por ejemplo pelar las cabezas y conservarlas al 90% de alcohol o al 10% de formaldehído tamponado. Esta última opción está particularmente indicada si se pretende teñir las mandíbulas con PAS. En cualquier caso, se busca con estas dos soluciones fijar los tejidos permitiendo así la inspección de los molares *in situ*.

Si el análisis se ha de realizar en piezas aisladas de los maxilares, éstos deben colocarse en el autoclave a 120°C durante 3-5 minutos en función de la edad del animal con lo que se podrán extraer fácilmente las piezas (28).

El siguiente paso antes de iniciar el recuento propiamente dicho de las lesiones cariosas consiste en preparar no ya los maxilares sino las piezas dentales. Existen para ello diversos procedimientos de tinción:

(1) Tinción de nitrato de plata:

Una vez tenemos la cabeza separada del resto del cuerpo se abre la boca de la rata y se depositan dos o tres gotas de la solución de nitrato de plata al 1%. Transcurridos uno o dos minutos se elimina la solución, se presiona ligeramente la cabeza y se extraen los maxilares. El nitrato de plata reaccionará con los fosfatos disponibles por acción del calor y de la luz. Así, a nivel de las lesiones cariosas los fosfatos de plata que presentan una coloración amarillenta quedan rápidamente reducidos a plata adoptando un aspecto negrozco.

(2) Reactivo de Schiff:

Este procedimiento fue propuesto por König y colaboradores en 1958 y consistía en preparar los maxilares manteniéndolos en formol al 10% durante por lo menos 24 horas.

Se eliminan luego los tejidos blandos y se efectúan una serie de secciones seriadas del maxilar. El maxilar así seccionado y conteniendo los molares se seca con aire durante unas horas o manteniéndolo en el horno una hora a 50°C. Posteriormente se puede aplicar ya una gota de la solución de reactivo de Schiff dejándola actuar durante 15 segundos y limpiándose luego con agua. Con este método no se teñirán la dentina ni el esmalte maduro mientras que todas las áreas de esmalte cariado o inmaduro adoptarán una coloración entre rojiza y violácea como consecuencia de la presencia en estas zonas de productos intermediarios de la proteólisis que contienen grupos aldehído (29).

(3) Otros procedimientos de tinción:

Se ha tratado de utilizar una serie de productos capaces de reaccionar con el esmalte disponible en el área degenerada como resultado del ataque carioso. Así existe una técnica que utiliza una solución saturada de sal "Kernechtrot B". Otra técnica utiliza una solución de Murexide (60 mg por 100 ml de una solución de etanol al 70% en agua destilada) en la que se introducen durante 5-10 horas los maxilares correctamente limpiados. Con esta técnica el esmalte degenerado adquiere una coloración rojo-rosácea. Las piezas así teñidas pueden guardarse secas y protegidas de la luz durante largos períodos de tiempo sin que se produzcan pérdidas sustanciales de coloración.

F/ TECNICAS DE CUANTIFICACION DE CARIES:

Una primera forma de valorar la caries es por supuesto, *in vivo*. Para ello, el animal, generalmente mono o hámster, es correctamente anestesiado de manera que se pueda conseguir mediante diferentes métodos mecánicos una correcta apertura bucal que posibilite la visualización de las lesiones cariosas con un microscopio estereoscópico de bajo poder. Este procedimiento descrito por Johansen no es sin embargo válido para estudios sobre ratas pues requiere una apertura bucal excesiva. Pasamos pues a describir aquellos procedimientos utilizados en estudios *post-mortem* para cuantificar las lesiones de caries en la rata y que pueden dividirse en tres grandes grupos: los que consideran la incidencia de caries, los que estudian el volumen de tejido dentario degenerado y por último, los que intentan discriminar las características y extensión de las lesiones utilizando piezas dentales previamente seccionadas.

En cualquier caso, y sea cual sea el procedimiento escogido, las mandíbulas y maxilares deberían ser codificadas por una persona diferente de la que va a efectuar el recuento de caries enmascarando así la identidad del grupo a que pertenece cada animal. Igualmente deberían examinarse en cada sesión un número determinado de mandíbulas que no resultase excesivo pues el cansancio del observador puede ser fuente de error.

Igualmente, en cada sesión debería examinarse un número parejo de mandíbulas procedentes de cada grupo de estudio.

a/ Estudios de incidencia:

Como su nombre indica, estos estudios se limitan a verificar el número de piezas aquejadas de un proceso carioso. Por tanto, en el caso de la rata o el hámster la puntuación máxima será de 12 si lo que valoramos es el número de piezas cariadas. Sin embargo, también pueden realizarse estudios de esta índole que valoren no el número de piezas afectadas sino el de lesiones observables.

En los dos casos, las valoraciones se suelen efectuar con microscopios estereoscópicos de 50 aumentos.

Estos estudios son útiles sobre todo para valorar amplias diferencias entre tratamientos. su gran ventaja radica en su sencillez.

b/ Cuantificación del volumen de área cariada:

Uno de los métodos de esta índole que más difusión ha alcanzado es el descrito por Keyes en 1944. Consiste en establecer unas unidades de área siguiendo unas proporciones que permitan relacionarlas entre sí para luego pasar a analizar la profundidad de cada área degenerada asignándole un valor de 1, 2 ó 3 en función de si ésta es de 0,1-0,2 mm, 0,2-0,4 mm o de 0,4-0,6 mm. Se obtiene así mediante el producto del área por el de la profundidad una valoración de la cantidad de tejido patológico.

Existe sin embargo el inconveniente con este método de que al localizarse el límite entre las diferentes áreas a nivel de los surcos, que es por otro lado donde precisamente se acostumbran a iniciar las lesiones, los resultados pueden no ser todo lo fiables que cabría esperar.

Para solventar este problema, este método se ha ido perfeccionando mediante la utilización de fotografías de los molares con las que confeccionar unas targetas de valoración provistas de unos espacios en los que anotar los datos del animal y los límites de la lesión. La estimación del área cariada se puede establecer entonces mediante el uso de un planímetro que permite leer el porcentaje de tejido afectado. Este procedimiento de recuento de caries ha sido utilizado sobre todo en estudios con una duración de entre 80 y 120 días.

En los últimos años sin embargo, se tiende a realizar protocolos experimentales de menor duración centrados no tanto en el análisis de los procedimientos de destrucción como en el mecanismo de iniciación de las lesiones y su localización.

Reviste entonces mayor interés el correcto análisis de las lesiones de las fisuras, no debe extrañarnos por tanto la amplia difusión que están alcanzado aquellos procedimientos de recuento que efectúan previamente una sección de los molares y una tinción de las lesiones pues sin duda, permiten una observación más detallada de las lesiones de los surcos. Pasamos pues a presentar estos procedimientos.

c/Cuantificación de caries en dientes seccionados:

Estos métodos se centran más en el estudio de las lesiones de cada área de los molares incluyendo caras interproximales y surcos. Para ello, necesitan de la realización de secciones seriadas ya sea mesio-distales u ocluso-gingivales con lo que al mismo tiempo se consigue visualizar mejor la profundidad alcanzada por la lesión.

Como decíamos, estos estudios son sobre todo útiles cuando el período de experimentación no es excesivo pues si se hubiesen producido grandes destrucciones las lesiones de diferentes áreas confluirían con lo que se perdería gran parte de la discriminación que son capaces de proporcionar estos procedimientos. Se recomiendan por tanto, cuando se quiera evaluar la caries con alguna de estas técnicas, condiciones de cariogenicidad moderadas o períodos de experimentación relativamente breves.

Probablemente, dentro de los procedimientos de este tipo, uno de los más ilustrativos sea el descrito por Keyes en 1958 (30).

Esta técnica consiste en, una vez obtenidos los maxilares, proceder a su limpieza, tinción y secado. Se pintan luego si es posible los molares con aceite pues se visualizarán así mejor las lesiones que no mojándolos con agua.

Este procedimiento divide, siguiendo el tamaño de cada molar, las superficies de las piezas mandibulares en unidades lineales: 6 para el primer molar y 4 para los otros dos molares.

Se valora entonces el número de áreas lesionadas en cada cara comenzando por la oclusal y continuando por la bucal y la vestibular. El valor obtenido por cada lesión se multiplica por un factor determinado en función de la profundidad de esta lesión (1 si afecta a esmalte, 2 si dentina superficial, 3 si dentina media y 4 si la dentina profunda está afectada). Para la valoración de las caras proximales y de las lesiones de surcos se procede a la sección sagital de las mandíbulas procediéndose luego a la observación de las dos hemimandíbulas así obtenidas. Todos los valores obtenidos se anotan en una tarjeta individual que podemos observar en la página 84 para cada animal de manera a sumar fácilmente los totales para cada cara de los seis molares.

Se trata de un método sencillo y útil que permite valorar no sólo la incidencia sino también la severidad de la caries en las diferentes zonas de la piezas de la rata sin consumir excesivo tiempo con la ventaja añadida de que los datos así obtenidos pueden ser estadísticamente interpretados. Todo ello ha ocasionado una aceptación casi universal de este modelo de recuento de caries en protocolos de experimentación de caries en ratas.

Caries dental experimental en las ratas

Régimen _____ Rata N.º _____
 _____ Jaula n.º _____

Totales mandibulares				
Lesiones	E	D _s	DM	D _x
Buco lingual				
Oclusal				
Del surco				
Proximal				

		Molares mandibulares				Número de caries				
E	D _s	DM	Izquierda		Derecha		E	D _s	DM	D _x
			E	D _s	DM	D _x				
Vestibular										Vestibular
Oclusal										Oclusal
Lingual										Lingual
Del surco										Del surco
Proximal										Proximal

NIH780 (Rev. 8-53) (Form. 17) PHS-3476

15-105

Ficha para el recuento de las caries en dientes de rata. E, esmalte; D_s, ligera implicación de la dentina; D_m, implicación moderada de la dentina; D_x, implicación extensa de la dentina; P, proximal.

V/ OBJETIVOS:

Mediante este estudio, pensamos cumplir esencialmente cuatro grandes objetivos que pasamos a presentar:

1/ Valorar la presencia de flúor en saliva tras la administración de los diferentes preparados con el objetivo de valorar la viabilidad del método de administración empleado en el estudio.

2/ Valorar el efecto preventivo del fluoruro sódico al 0,1% en su forma liposomada en el desarrollo de la caries en ratas de experimentación sometidas a dieta cariogénica y a xerostomía inducida con antidepresivos tricíclicos (clomipramina en dosis diaria de 50 mg/kg. V.O. con sonda intragástrica).

Se comparará la incidencia de caries en el grupo tratado con fluoruro sódico liposomado en la dosis antes expuesta con la obtenida en un grupo que podemos calificar de "control positivo" pues estará tratado con fluoruro sódico sin liposomar al 0,2%

3/ Estudiar el efecto preventivo de la administración combinada de fluoruro sódico liposomado al 0,1% y de cloruro cálcico liposomado al 0,15% en la aparición de caries y comparar este efecto al conseguido con los otros dos preparados de flúor utilizados.

VI/ MATERIAL Y METODOS:**VI.1/ ESPECIE SELECCIONADA Y PIEZAS DENTALES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO:**

La especie de rata seleccionada ha sido del tipo Wistar. En concreto se han utilizado 50 machos. En lo que concierne a las piezas dentales sobre las que se efectuará el recuento de caries al final del estudio, teniendo en cuenta la duración de éste, la edad de los animales y las condiciones cariogénicas adoptadas, se decidió realizarlo sobre los seis molares mandibulares.

VI.2/ DISTRIBUCION, IDENTIFICACION Y SEGUIMIENTO DE LOS ANIMALES:

El día 18 de vida, los 50 machos implicados en el estudio fueron distribuidos aleatoriamente en 10 jaulas a razón de 5 animales en cada una de manera a establecer así 5 grupos de tratamiento con 10 ratas cada uno (2 jaulas para cada grupo). Por ello, las jaulas fueron identificadas como 1 y 1 bis para el grupo 1, 2 y 2 bis para el grupo 2, 3 y 3 bis para el grupo 3, 4 y 4 bis para el grupo 4 y por último, 5 y 5 bis para el grupo 5.

Las 5 ratas de cada jaula fueron marcadas con agujeros en las orejas con el objetivo de permitir su posterior identificación de la siguiente manera: a la "primera" no se le marcaban las orejas, a la "segunda" se le efectuaba un orificio en la oreja izquierda, a la "tercera" uno en la derecha, a la "cuarta" le eran practicados dos en la izquierda y finalmente, a la "quinta", dos en la derecha.

_ Seguimiento:

. **Peso:** Los animales eran regularmente pesados a razón de una vez por semana a partir del día 18 de vida y hasta el día de su sacrificio (31).

. **Comida y bebida:** Las cantidades de comida y bebida ingeridas eran medidas y anotadas a días alternos tres veces por semana (los lunes, miércoles y viernes) (31).

VI.3/ DURACION DEL ESTUDIO Y CONDICIONES DE EXPERIMENTACION:

La duración prevista para el estudio ha sido de seis semanas pues se ha efectuado sobre ratas de 18 días de edad y hasta que cumplieren 61 días, es decir que ha durado exactamente 44 días. No se han seguido condiciones de gnotobiosis especiales si bien se ocasionó al inicio del estudio una infección de la cavidad oral por microorganismos cariogénicos pero podemos calificar el protocolo como convencional en lo relativo a este apartado pues no se han adoptado medidas posteriores destinadas a evitar sobreinfecciones por otros microorganismos.

VI.4/ GRUPOS DE TRATAMIENTO:

Pasamos a presentar en este apartado qué medida preventiva de caries era la adoptada en cada grupo recordando en cada caso si el animal estaba inmerso en las condiciones cariogénicas o no.

Grupo 1: No condiciones cariogénicas.

Grupo 2: Condiciones cariogénicas respetadas.

Enjuagues con agua corriente.

Grupo 3: Condiciones cariogénicas respetadas.

Enjuagues con FNa no liposomado al 0,2%.

Grupo 4: Condiciones cariogénicas respetadas.

Enjuagues con FNa liposomado al 0,1%.

Grupo 5: Condiciones cariogénicas respetadas.

Enjuagues con ClCa al 0,15% liposomado.

15 minutos después, enjuague con FNa al 0,1% liposomado.

_ Técnica de realización de los enjuagues:

Los enjuagues se realizaban mediante la inoculación del preparado asignado a cada grupo en la cavidad oral del animal previamente anestesiado por inmersión en un medio saturado de éter.

La inoculación se efectuaba mediante una micropipeta y efectuándose una en cada hemimandíbula con un lapso de tiempo de aproximadamente 30 segundos entre cada una que se destinaba al friccionamiento del área buccinatoria de la hemimandíbula a la que se le había realizado la inoculación.

La razón de trabajar con animales previamente anestesiados es facilitar así esta inoculación del preparado y la realización de un suave masaje durante 30 segundos en la región buccinatoria de manera a favorecer la distribución de la solución en el conjunto de la cavidad oral. Asimismo, la anestesia del animal incrementa el tiempo de permanencia del inoculado en la cavidad oral.

En el caso del grupo n° 5 se procedió a la inoculación en primer lugar del preparado de ClCa al 0,15% liposomado tras una primera anestesia y 15 minutos después se volvía a anestesiarse a los animales para proceder a la inoculación de la solución de FNa al 0,1%. Se esperaba así impedir la precipitación que podría producirse caso de realizarse la inoculación de ambos preparados simultáneamente.

_ Naturaleza de los liposomas empleados y cantidades empleadas:

Los animales de los grupos 4 y 5 recibían mediante una inoculación efectuada con una micropipeta 25 microlitros de un preparado liposomal de fluoruro sódico al 0,1% en cada hemimandíbula.

En lo referente al grupo 5, como ya hemos señalado, aproximadamente 15 minutos antes de esta administración del preparado de flúor, ya habían sido anestesiados una primera vez y se les había administrado 50 microlitros en cada hemimandíbula de un preparado liposomal de cloruro cálcico al 0,15%.

En ambos casos, los liposomas tenían un tamaño de 150 nm. con una gran homogeneidad de tamaño.

En lo referente al grupo que recibía fluoruro sódico sin liposomar al 0,2%, la cantidad inoculada en cada hemimandíbula era de 25 microlitros. Por último, el grupo **Topic Control** recibía la misma cantidad pero en este caso, de agua corriente.

I.5/ CONDICIONES CARIOGENICAS:

Queremos señalar en un inicio que, como ya hemos indicado en el párrafo precedente, todas las medidas cariogénicas adoptadas fueron aplicadas sin distinción a los 5 grupos con excepción del primero que constituía el grupo control. Como decíamos, a los otros 4 grupos se les aplicaron idénticas medidas destinadas a promover la caries pues estos grupos sólo se diferenciaban entre sí en el tipo de agente cariostático que recibían. Estas conciciones cariogénicas eran las siguientes:

_ Dieta:

Todos los animales con excepción de los del grupo control fueron alimentados con dieta cariogénica St 580 (4) compuesta por:

Humedad.....	8,0 %.
Proteína bruta.....	9,2 %.
Lípidos.....	8,5 %.
E.N.A. (glúcidos).....	72,5 %.
Cenizas.....	1,5 %.

Por el contrario, el grupo 1 o control recibía una alimentación no cariogénica constituída por una dieta de mantenimiento de rata de referencia A04 Panlab^r compuesta por:

Humedad.....	12,0 %.
Proteína bruta....	17,2 %.
Grasas brutas.....	2,7 %.
Fibra bruta.....	3,9 %.
Minerales.....	4,4 %.
Gúcidos.....	59,7 %.
Valor calórico (Kcal/kg)	3100.

El agua administrada era para los cinco grupos agua corriente *ad libitum*.

_ Elemento bacteriano:

En los cuatro grupos sometidos a condiciones cariogénicas se ocasionó una sobreinfección de la cavidad oral por *estreptococcus mutans* tras el abandono de la lactancia materna mediante la inoculación en dicha cavidad de 0,2 ml de una suspensión de 10^8 cel/ml del citado microorganismo y la adición de 1 ml de esta suspensión en el agua de bebida. Estos procedimientos se efectuaron los días 18, 19 y 20 de vida de los animales (32).

_ Agente xerostomiante:

Como agente xerostomiante se utilizó un antidepresivo tricíclico como la clomipramina (Anafranil^r) entre cuyos efectos secundarios está ampliamente documentada su acción xerostomiante. Este fármaco fue aplicado de manera ininterrumpida a partir del día 21 de vida de los animales y 4 del estudio y hasta el previo a su sacrificio (día 43 del estudio) por vía oral mediante una sonda intragástrica y a razón de una dosis de 50 mg/kg diaria. Se administró como ya hemos señalado a los 4 grupos sometidos a condiciones cariogénicas es decir a todos con excepción del grupo control.

VI.6/ SACRIFICIO DE LOS ANIMALES Y DETERMINACION DE FLUOR SALIVAR:**_ Técnica de sacrificio y recogida de saliva:**

El día 61 de vida de los animales (44 del estudio) y tras un período de ayuno de 8 horas, se anestesiaron los animales por inmersión en un medio saturado de éter para proceder seguidamente a la administración del enjuague de la misma manera que se había hecho a lo largo del estudio.

Se les administraba acto seguido una dosis de 10 ml/kg al 10% de uretano por vía intraperitoneal con el objetivo de conseguir una anestesia más duradera que facilitase la recogida de saliva posterior así como el sacrificio del animal.

A continuación, se les administraba también por vía intraperitoneal una dosis de pilocarpina de 10 mg/kg con el fin de favorecer la secreción salival. Transcurridos 2 minutos, esta secreción salival era aspirada de la cavidad oral de cada animal mediante una pipeta Pasteur durante 15 minutos con el fin de establecer una determinación posterior de la cantidad de flujo salivar secretado así como de la cantidad de flúor presente en saliva.

Pasados estos 15 minutos, los animales eran sacrificados mediante decapitación.

_ Cuantificación de la concentración de flúor en saliva:

Tras haber medido la cantidad de saliva secretada por cada animal, se procedió a agrupar la saliva del conjunto de ratas de un mismo grupo de tratamiento con el objetivo de tener una cantidad suficiente como para proceder a la medición de la concentración salivar de flúor mediante un electrodo de flúor. Mientras tanto, la saliva recogida fue conservada a -40°C .

Esta medición se efectuó en el Servei Científico-Tècnic de la Universitat de Barcelona siguiendo unos pasos determinados: comprobación del electrodo, determinación de una recta logarítmica de regresión a partir de unos patrones determinados, lectura de las muestras y conversión de la lectura obtenida en mV en ppm.

Para proceder a la comprobación del electrodo se introducen en un tubo de ensayo 45 ml de agua destilada, 0,5 ml de una solución de flúor a una concentración de 100 ppm y 5 ml de una solución tamponadora denominada TISAB III. Transcurridos 4 minutos se procede a efectuar la lectura obteniéndose un primer valor en mV al que restaremos el segundo valor obtenido 4 minutos después de haber añadido a la solución anterior 5 ml de un preparado de flúor a 100 ppm.

La diferencia entre estos dos valores debe situarse entre 54 y 60. De lo contrario, puede afirmarse que el electrodo no está correctamente calibrado.

Acto seguido, y mediante la lectura obtenida a partir de unos patrones determinados se establece una recta de regresión logarítmica. Estos patrones consisten en 5 soluciones de 10 ml cuya concentración en flúor va aumentando progresivamente.

Así, la primera solución tiene una concentración nula en flúor. Se obtiene pues a partir de 9 ml de agua destilada y 1 ml de la solución tamponadora adicionado en el momento de realizarse la lectura.

La segunda solución se obtiene a partir de 0,5 ml de un preparado de flúor a 10 ppm, 8,5 ml de agua destilada y 1 ml de la solución tamponadora. Por tanto, esta segunda solución tiene una concentración en flúor de 0,5 ppm.

Siguiendo el mismo procedimiento se obtienen las restantes soluciones cuya concentración en flúor será de 1 ppm, 5 ppm y 10 ppm.

Se procede a continuación a la lectura de las muestras teniendo en cuenta que ésta debe efectuarse siempre sobre 10 ml de preparado obtenidos a partir de los ml de saliva de que dispongamos a los que añadiremos 1 ml de TISAB III destinado a mantener el pH de las muestras en un valor de 7. Por tanto, si la cantidad de saliva recogida es inferior a 9 ml, deberemos añadir los ml de agua destilada que hagan falta hasta alcanzar este valor.

A partir de la recta de regresión logarítmica obtenida a partir de los patrones se extrapolará la lectura obtenida en mV en ppm. Sin embargo, para conocer la concentración final de flúor de las muestras deberá modificarse el valor anteriormente obtenido mediante la aplicación del valor de conversión correspondiente a los ml de agua que se hayan tenido que añadir si no se disponía de 9 ml de saliva así como al ml de la solución tamponadora.

VI.7/ TINCION DE MOLARES Y RECUENTO DE CARIES:**_ Procedimiento de tinción de los molares:**

Una vez sacrificados los animales, se procedió a la extracción de las mandíbulas rechazando los tejidos blandos y conservándolas luego en etanol. Posteriormente, y con el fin de teñir las lesiones de caries, se depositaron las mandíbulas por un período de 6 horas en una solución de Murexide (60 mg/100ml de etanol al 70 % en agua destilada).

Transcurridas estas 6 horas y hasta proceder al recuento de caries, las mandíbulas se conservaron cuidadosamente identificadas en seco.

_ Recuento de caries:

La técnica seleccionada para proceder a la valoración de las lesiones de caries se fundamenta en la técnica clásica de Keyes. Sin embargo, nos hemos ceñido al recuento de las lesiones localizadas a nivel de los surcos pues al realizarse su observación en hemimandíbulas seccionadas sagitalmente, la valoración de la profundidad alcanzada por la lesión resulta mucho más fiable en este caso que no cuando se observan las lesiones de las caras oclusales, vestibulares o linguales ya que su análisis se realiza sin previa sección de las mandíbulas.

Esta sección de las hemimandíbulas se efectuó en sentido ocluso-gingival mediante un disco de diamante fino de doble cara montado en pieza de mano.

Sabemos que en el método de Keyes (29) se divide la superficie de cada cara de los molares en un número determinado de áreas. En el caso de la valoración de los surcos, conviene recordar en primer lugar que en el primer molar podemos encontrar 3 surcos mientras que en el segundo y tercer molar se localizan 2 y 1 surco respectivamente como podemos apreciar en la **fotografía n° 1** de la página n° 102 en la que podemos apreciar los tres molares mandibulares seccionados ocluso-gingivalmente cada uno con su número correspondiente de surcos. Como decíamos, a cada uno de estos surcos se les va a asignar un número determinado de áreas en función de sus dimensiones. Así, en el caso del segundo surco del primer molar y del primer surco del segundo molar, al ser los de mayor tamaño, se les asignan 3 áreas. Por el contrario, al resto de surcos les corresponden 2 unidades de área. En la página n° 102 tenemos un buen ejemplo al respecto en la **fotografía n° 2** en la que podemos apreciar claramente las diferencias de tamaño entre los dos surcos del segundo molar (a la izquierda el mesial y a la derecha el distal).

Así, si queremos cuantificar el tamaño de una lesión, si ésta se extiende a lo largo de todo el surco, siendo éste uno de los de mayor tamaño, se le asignará un valor de 3 mientras que si el surco es uno de los de menor tamaño, el valor asignado será de 2.

Si por el contrario, la lesión no se extiende a lo largo de todo un surco y éste es uno de los de mayor tamaño, habrá que valorar si ocupa una unidad o bien dos. En el caso de un surco de menor tamaño, si ocupa menos de la mitad de su extensión, se le asignará un valor de 1 mientras que si se extiende más allá, se le otorga un valor de 2 pues se entiende que la lesión ha abarcado las dos unidades de área definidas para estos surcos.

Esta primera valoración se refiere a lo que podríamos denominar tamaño de la lesión en superficie.

Obtenemos así unos valores en función de la extensión de la lesión a lo largo del surco; sin embargo, la principal ventaja de proceder a la observación de las lesiones en hemimandíbulas seccionadas sagitalmente radica en que podemos valorar también la profundidad de la lesión, su cercanía a pulpa, es decir que tenemos una referencia de la virulencia del ataque carioso. Para ello, multiplicaremos este primer valor obtenido por otro que variará en función de la proximidad de la lesión a la pulpa y ello para cada unidad de área que hallamos considerado cariada en la primera observación.

De esta manera, si la lesión está localizada en esmalte, se multiplica el primer valor por uno; si la lesión se extiende en menos del 50% de la superficie dentinaria se considera que es una lesión de dentina superficial y se multiplica el primer valor por 2. Si por el contrario, la lesión se extiende más allá del 50% de la dentina, se dice que es una lesión de dentina media y se le asigna un valor de 3 que será por el que multiplicaremos el valor obtenido en la primera observación. Por último, si a lo largo de toda su extensión la lesión alcanza pulpa, es decir que es una lesión de dentina profunda, se multiplicará el primer valor por 4.

En las páginas siguientes podemos apreciar en la **fotografía n° 2** una lesión de dentina superficial localizada en el surco mesial de un segundo molar en la que se aprecia la coloración de la dentina patológica así como la ruptura del esmalte.

En la **fotografía n° 3** por el contrario se aprecia como en el mismo surco mesial de un segundo molar la lesión ha alcanzado a nivel distal una profundidad que ya consideramos como de dentina media. Por último, presentamos también la **ficha n° 1** que pensamos, ilustra con claridad los criterios seguidos para valorar tanto la extensión en superficie como en profundidad de las lesiones.

Obtenemos de esta manera un valor para la hemisección de la hemimandíbula que ilustra tanto la extensión en superficie como en profundidad de las lesiones en ella hallada. Sin embargo, antes de aceptar este valor como el definitivo de la hemimandíbula, hemos de analizar de la misma manera la otra hemimandíbula quedándonos finalmente con el valor más alto de los dos hallados.

Con esta doble observación conseguimos obviar posibles omisiones de lesiones resultantes de un corte no realizado de manera perfectamente simétrica o de lesiones que no se localizasen a lo largo de todo el surco pues en ambos casos la lesión podría observarse en una hemisección pero no en la otra.

Los valores finalmente obtenidos se anotan en una targeta individual para cada animal a semejanza de la que hemos presentado en el capítulo *La rata como animal de experimentación de caries*.

Todas estas observaciones fueron efectuadas con una lupa estereoscópica de 40 aumentos Olympus SZ4045TR.

Este recuento de caries de surco fue efectuado por tres observadores obteniéndose finalmente un valor para cada animal resultado de la media de las tres mediciones.

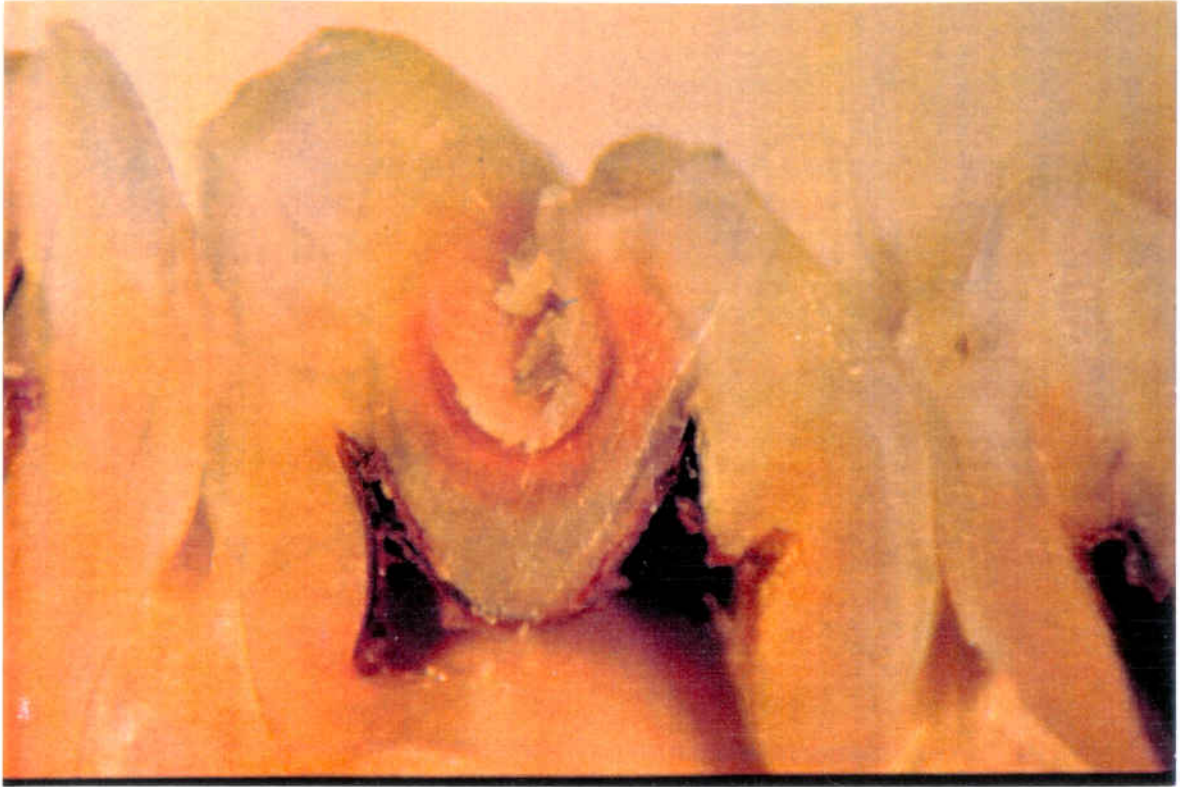
Antes de realizarse estas mediciones, un cuarto experimentador procedió a codificar la identidad de los animales de manera que los observadores desconociesen el grupo de tratamiento a que pertenecía cada animal.



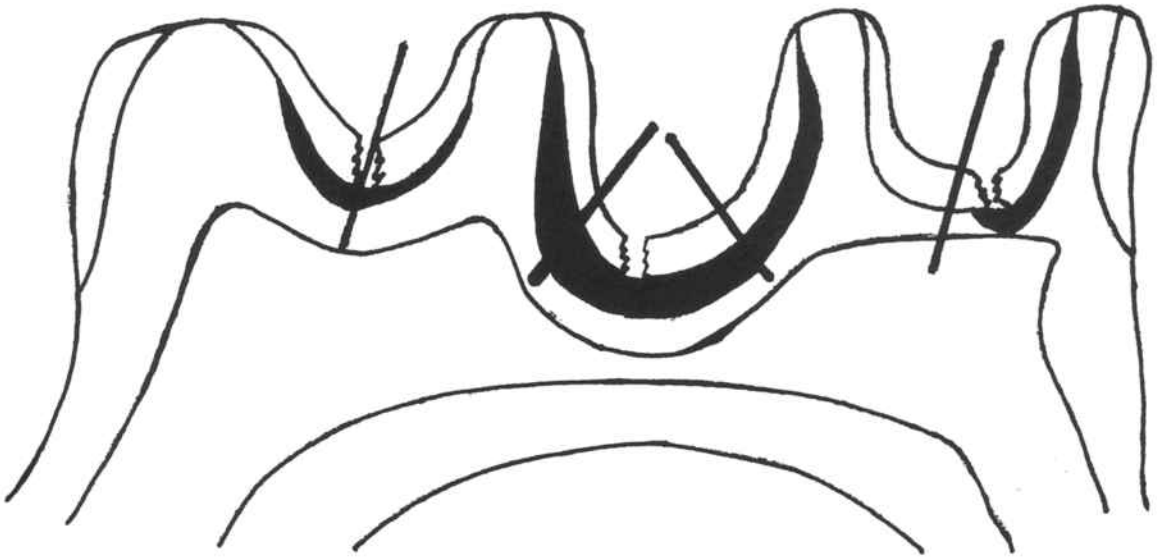
. Fotografía n° 1: Hemimandíbula seccionada ocluso-gingivalmente.



. Fotografía n° 2: Segundo molar. Valorar el tamaño de los surcos y la lesión de dentina superficial en el surco mesial.



. **Fotografía nº 3:** Segundo molar. Valorar la lesión de dentina media a nivel distal de su surco mesial.



- FICHA Nº 1: CUANTIFICACIÓN CARIES EN SURCOS.

. PRIMER MOLAR SECCIONADO SAGITALMENTE. AREAS AFECTADAS.

*** Surco distal:** . **Extensión:** 2 áreas afectadas.
 . **Profundidad:** caries esmalte.

*** Surco medio:** . **Extensión:** 3 áreas afectadas.
 . **Profundidad:** Caries dentina superficial. Por tanto, tambien hay 3 áreas de esmalte afectadas.

*** Surco mesial:** . **Extensión:** 1 área afectada.
 . **Profundidad:** Caries dentina media. Por tanto, tambien hay un área de esmalte y una de dentina superficial afectadas.

*** Valor final asignado:**

. **Areas esmalte:** $(2+3+1) \times 1 = 6$.
 . **Areas dentina superficial:** $(3+1) \times 2 = 8$.
 . **Areas dentina media:** $1 \times 3 = 3$.
 . **Areas dentina profunda:** 0.
 . **Total:** $6+8+3 = 17$.

Recordamos que habrá que contrastar este valor con el que resulte de la observación del otro hemimolar.

/ señala el límite de cada área para cada surco.

VI.8/ TRATAMIENTOS ESTADISTICOS:

Los datos obtenidos se han tratado con un ordenador MacIntosh utilizándose los programas StatWork (33) y StatView (34). En concreto, se han analizado 6 variables:

- 1/ Incremento de peso / Peso inicial.
- 2/ Consumo de comida por animal y día.
- 3/ Consumo de bebida por animal y día.
- 4/ Flujo salivar secretado en 15 minutos por animal.
- 5/ Concentración de flúor en saliva por grupo de tratamiento.
- 6/ Recuento de caries de surco.

- Estadística descriptiva:

Para todas las variables analizadas se han calculado los parámetros estadísticos siguientes: media, desviación estándar, error estándar de la media, varianza, coeficiente de variación, número de observaciones, valores máximo y mínimo, rango, suma de los valores de la variable, suma de los cuadrados, número de valores perdidos, percentiles, Kurtosis y Skewness.

- Estadística comparativa:

Se efectuó en primer lugar la prueba de Normality test del programa estadístico StatWork con la finalidad de comparar en cada grupo y para cada variable la distribución normal de los datos pues ello nos permite seleccionar adecuadamente el test de comparación a utilizar. Así, aquellas variables que se ajustaban a una distribución normal se sometieron a un análisis de la varianza ANOVA, del programa StatView con el fin de saber si las diferencias halladas entre las poblaciones de diferentes grupos de estudio eran estadísticamente significativas. Podemos saber de esta manera si los grupos de estudio forman parte de poblaciones diferentes o no. Esta prueba compara los grupos dos a dos para cada una de las variables analizadas. Para valorar la significación de las diferencias, disponemos del test de Scheffe-F, test paramétrico de análisis de la varianza. Opcionalmente disponemos del test de Fisher y del test de Dunnett, siendo los tres tests calculados siguiendo la metodología ANOVA del programa StatView. El método ANOVA es un método estadístico que contrasta la posible igualdad entre dos o más medias poblacionales utilizando muestras independientes (35).

VII/ RESULTADOS Y DISCUSION

Como ya hemos señalado, las variables analizadas son:

1/ Incremento de peso/ peso inicial.

Con ello, obtenemos un valor relativo que nos permite valorar cuántas veces ha multiplicado cada animal su peso. Hemos preferido utilizar esta variable a otras posibles como por ejemplo el peso final, pues en ésta obviamos posibles diferencias derivadas de la presencia al inicio del experimento de animales con un peso inicial diferente.

2/ Consumo de comida/ rata/ día (g).

3/ Consumo de bebida/ rata/ día (ml).

Con estas dos medidas pretendemos comprobar el estado de salud de los animales así como verificar que los patrones de consumo de comida y bebida se corresponden con los obtenidos en años anteriores por este mismo departamento (36 y 37).

4/ Flujo salivar (ml/15 min).

No hay que olvidar al analizar esta variable el número de animales presentes en cada grupo en el momento de efectuarse esta medición ya que, como señalaremos más adelante, a lo largo del estudio se produjeron un cierto número de fallecimientos por lo que si en los grupos **Control** y **Topic control** se recogió la saliva de 10 animales, en el grupo **Topic F 0,2%** tan sólo se almacenó la de 9 y en los grupos **Topic F 0,1% lip** y **Topic F+Ca Lip** la de 8 y 6 respectivamente.

5/ Concentración de flúor en saliva.

Se pretende con esta medición valorar la presencia de flúor en saliva en los diferentes grupos de tratamiento en los 15 minutos posteriores a la administración del preparado tópico.

6/ Caries de surco.

Esta medición se efectuó siguiendo la modificación de la técnica clásica de Keyes descrita en el apartado de *Material y Métodos*.

Para todas estas variables, hemos realizado una representación gráfica o figura, una tabla que recoge la descripción estadística y otra tabla que resume la comparación estadística entre grupos.

- GRUPOS DE TRATAMIENTO:

Recordamos a continuación los diferentes grupos de tratamiento especificando el nombre que se les ha asignado en el tratamiento estadístico.

Grupo 1 o grupo control: No condiciones cariogénicas.

Grupo 2 o topic control: Condiciones cariogénicas respetadas.

Enjuagues con agua corriente.

Grupo 3 o topic Fl 0,2%: Condiciones cariogénicas respetadas.

Enjuagues con FNa no liposomado al 0,2%.

Grupo 4 o topic Fl 0,1% lip.: Condiciones cariogénicas respetadas.

Enjuagues con FNa liposomado al 0,1%.

Grupo 5 o topic Fl+Ca lip: Condiciones cariogénicas respetadas.

Enjuagues con ClCa al 0,15% liposomado.

15 minutos después, enjuague con FNa al 0,1% liposomado.

- MORTALIDAD:

A lo largo del estudio fallecieron un cierto número de animales que pasamos a señalar, detallando el grupo a que pertenecían y el día en que se produjo el fallecimiento.

- **Grupo control:** No falleció ningún animal.

- **Grupo Topic control:** No falleció ningún animal.

- **Grupo Topic F 0,2%:** Falleció un animal el día 11 del experimento.

- **Grupo Topic F 0,1% lip:** Falleció un animal el día 9 de experimento.

Falleció otro animal mientras se procedía a la recogida de saliva por lo que sólo se almacenó la de 8 animales.

- **Grupo Topic F+Ca lip:** Falleció un animal el día 10.

Falleció otro animal el día 11.

Estas dos muertes tal vez fueron debidas a la doble anestesia con éter que recibían estos animales cada vez que se les efectuaba el tratamiento tópico.

Además, fallecieron otros dos animales mientras se procedía a recoger su saliva por lo que finalmente, sólo se recogió la saliva de 6 animales.

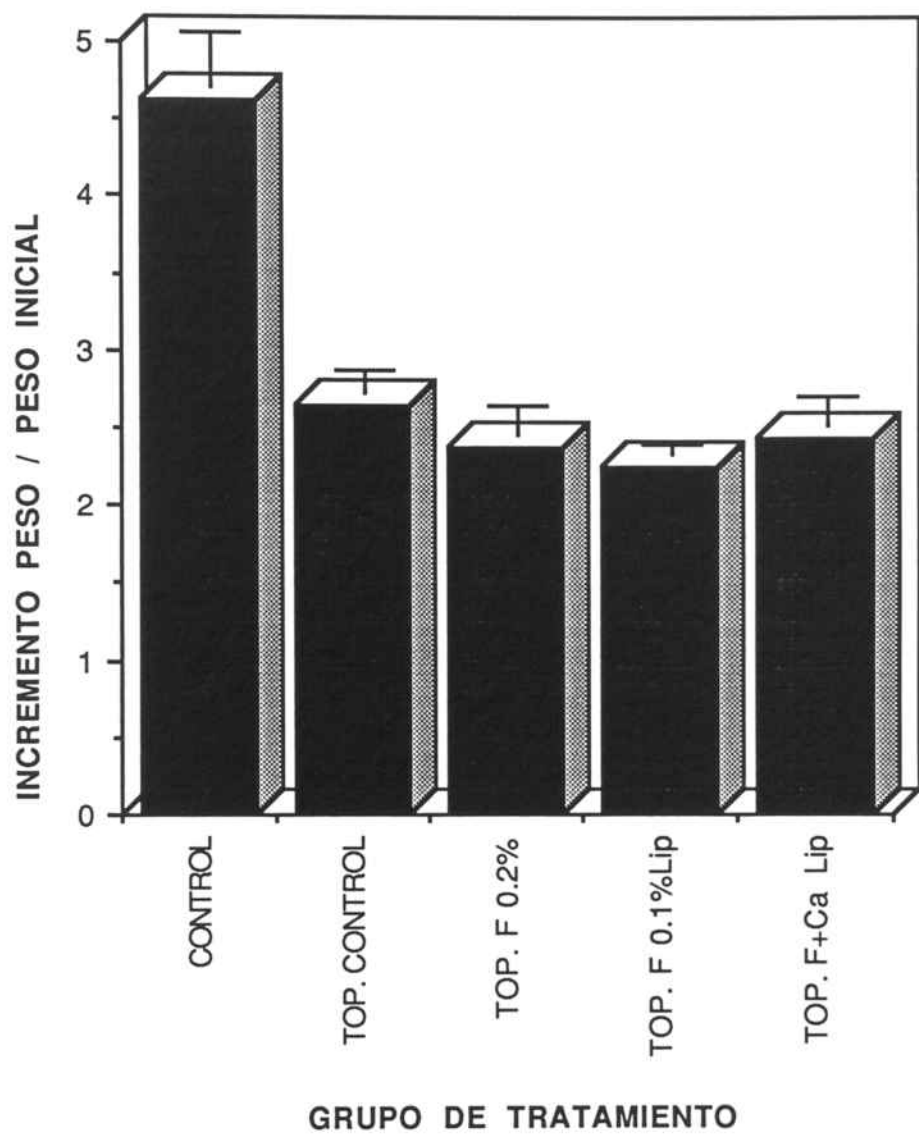


fig. 1

X1: CONTROL - Incr Pes/Pi					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
4,629	1,137	,359	1,292	24,553	10
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
3,641	7,476	3,835	46,294	225,942	79
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
,813	3,816	5,443	2,027	1,718	

tabla 1

X2: TOPIC CONTROL - Incr Pes/Pi					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
2,644	,445	,141	,198	16,815	10
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
1,732	3,39	1,658	26,437	71,67	79
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
,318	2,326	2,962	,251	-,455	

tabla 2

X3: TOPIC F 0.2% - Incr Pes/Pi					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
2,38	,518	,173	,268	21,756	9
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
1,658	3,119	1,461	21,416	53,105	80
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
,398	1,982	2,778	-1,226	,14	

tabla 3

X4: TOPIC F 0.1%LIP - Incr Pes/Pi					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
2,246	,232	,077	,054	10,311	9
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
1,91	2,626	,716	20,211	45,816	80
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
,178	2,068	2,424	-,956	,138	

tabla 4

X5: TOPIC F+CA LIP - Incr Pes/Pi					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
2,433	,526	,186	,277	21,613	8
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
1,772	3,289	1,517	19,464	49,292	81
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
,44	1,993	2,873	-,9	,254	

tabla 5

One Factor ANOVA X 1: GRUP TRACTAMENT Y 1: Incr Pes/Pi

Analysis of Variance Table

Source:	DF:	Sum Squares:	Mean Square:	F-test:
Between groups	4	38,597	9,649	22,083
Within groups	41	17,915	,437	p = ,0001
Total	45	56,512		

Model II estimate of between component variance = 1,003

tabla 6

One Factor ANOVA X 1: GRUP TRACTAMENT Y 1: Incr Pes/Pi

Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
CONTROL	10	4,629	1,137	,359
TOPIC CONTROL	10	2,644	,445	,141
TOPIC F 0.2%	9	2,38	,518	,173
TOPIC F 0.1%LIP	9	2,246	,232	,077
TOPIC F+CA LIP	8	2,433	,526	,186

tabla 7

One Factor ANOVA X 1: GRUP TRACTAMENT Y 1: Incr Pes/Pi

Comparison:	Mean Diff.:	Fisher PLSD:	Scheffe F-test:	Dunnett t:
CONTROL vs. TOPIC CONT...	1,986	,597*	11,28*	6,717
CONTROL vs. TOPIC F 0.2%	2,25	,613*	13,718*	7,408
CONTROL vs. TOPIC F 0.1...	2,384	,613*	15,399*	7,848
CONTROL vs. TOPIC F+CA...	2,196	,633*	12,267*	7,005
TOPIC CON... vs. TOPIC F ...	,264	,613	,189	,87

* Significant at 95%

tabla 8

One Factor ANOVA X 1: GRUP TRACTAMENT Y 1: Incr Pes/Pi

Comparison:	Mean Diff.:	Fisher PLSD:	Scheffe F-test:	Dunnett t:
TOPIC CON... vs. TOPIC F ...	,398	,613	,429	1,311
TOPIC CON... vs. TOPIC F...	,211	,633	,113	,672
TOPIC F 0.... vs. TOPIC F ...	,134	,629	,046	,43
TOPIC F 0.... vs. TOPIC F+...	-,053	,649	,007	,166
TOPIC F 0.... vs. TOPIC F+...	-,187	,649	,085	,583

tabla 9

I/ INCREMENTO DE PESO/ PESO INICIAL

I.1/ RESULTADOS:

- Representación gráfica (fig. n°1):

En ella podemos ver cuántas veces ha multiplicado a lo largo del estudio cada animal su peso.

- Descripción estadística (tablas n°1 a 5):

Las tablas n°1 a 5 nos muestran la descripción estadística detallada de cada grupo de estudio. Así, tenemos la media, la desviación estándar, el error estándar de la media, la varianza, el coeficiente de variación, el número de observaciones, los valores mínimo y máximo, el rango, la suma de los valores, la suma de los cuadrados, las pérdidas, los percentiles, la Kurtosis y el Skewness.

- Estadística comparativa (tablas n°6 a 10):

En la tablas n°6 y 7 tenemos una descripción de los grupos de estudio para aplicar una comparación de análisis de la varianza (ANOVA).

En las tablas nº8 y 9 observamos todas las comparaciones posibles entre los diferentes grupos de estudio.

I.2/ DISCUSION:

Observamos que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el grupo **Control** y los otros cuatro grupos. De entre las variables que distinguen este primer grupo de los otros cuatro, nos aventuramos a señalar la no administración de dieta cariogénica ni de clomipramina como aquellas que probablemente expliquen este mayor aumento de peso registrado en este grupo.

Por otro lado, entre los cuatro grupos sometidos a condiciones cariogénicas y que han recibido preparados tópicos no existen diferencias estadísticamente significativas por lo que podemos afirmar que ni la administración de flúor ya sea en forma libre o liposomada ni la de cloruro cálcico liposomado afectan significativamente ($p < 0,05$) al crecimiento.

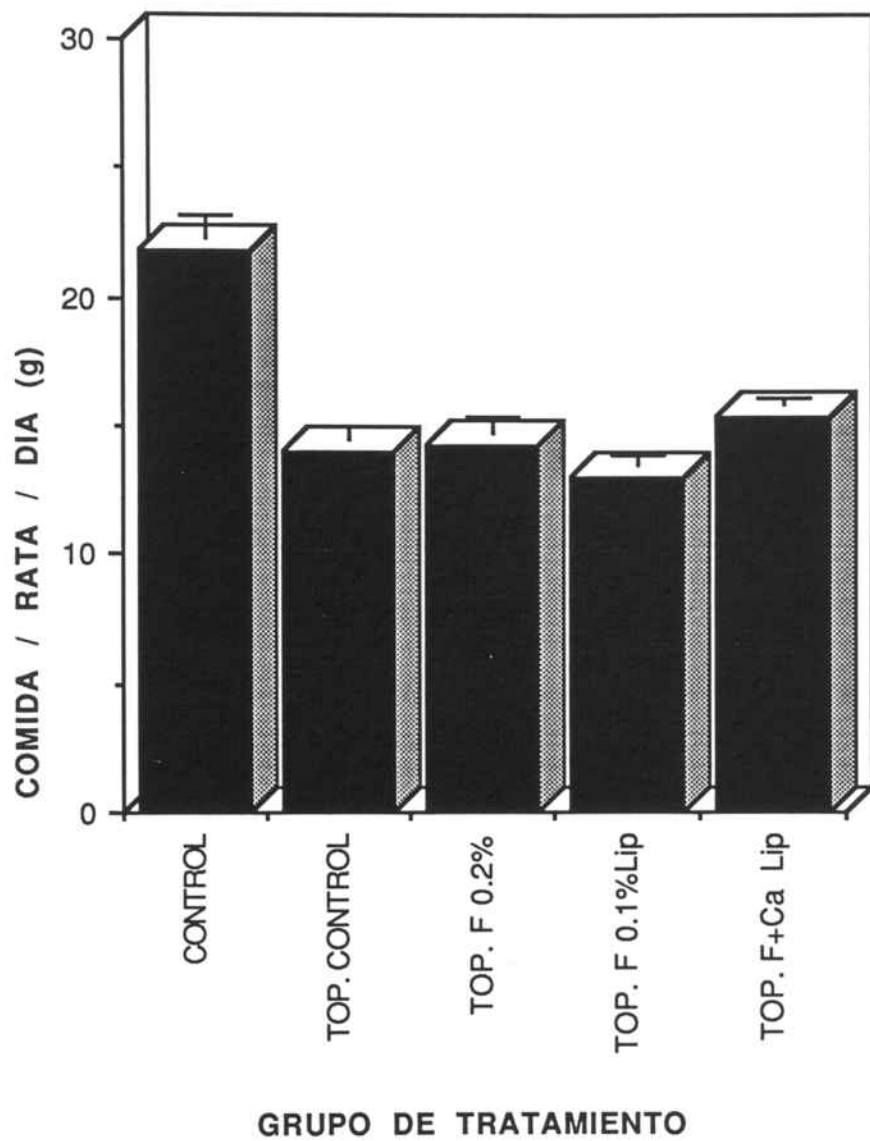


figura 2

X1: CONTROL - MENJAR/RATA/DIA					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
21,79	1,202	,85	1,445	5,517	2
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
20,94	22,64	1,7	43,58	951,053	14
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
10,8	10,99	32,59	-2	0	

tabla 10

X2: TOPIC CONTROL - MENJAR/RATA/DIA					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
14,065	,587	,415	,344	4,173	2
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
13,65	14,48	,83	28,13	395,993	14
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
5,273	8,792	19,338	-2	0	

tabla 11

X3: TOPIC F 0.2% - MENJAR/RATA/DIA					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
14,225	,94	,665	,884	6,611	2
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
13,56	14,89	1,33	28,45	405,586	14
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
8,45	5,775	22,675	-2	0	

tabla 12

X4: TOPIC F 0.1 % LIP - MENJAR/RATA/DIA					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
13,01	,481	,34	,231	3,696	2
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
12,67	13,35	,68	26,02	338,751	14
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
4,32	8,69	17,33	-2	0	

tabla 13

X5: TOPIC F+CA LIP - MENJAR/RATA/DIA					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
15,405	,219	,155	,048	1,423	2
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
15,25	15,56	,31	30,81	474,676	14
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
1,969	13,436	17,374	-2	-8,388E-18	

tabla 14

One Factor ANOVA X 1: GRUPS TRACTAMENT Y 1: MENJAR/RATA/DIA

Analysis of Variance Table

Source:	DF:	Sum Squares:	Mean Square:	F-test:
Between groups	4	98,52	24,63	41,701
Within groups	5	2,953	,591	p = ,0005
Total	9	101,473		

Model II estimate of between component variance = 12,02

tabla 15

One Factor ANOVA X 1: GRUPS TRACTAMENT Y 1: MENJAR/RATA/DIA

Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
CONTROL	2	21,79	1,202	,85
TOPIC CONTROL	2	14,065	,587	,415
TOPIC F 0.2%	2	14,225	,94	,665
TOPIC F 0.1 % LIP	2	13,01	,481	,34
TOPIC F+CA LIP	2	15,405	,219	,155

tabla 16

One Factor ANOVA X 1: GRUPS TRACTAMENT Y 1: MENJAR/RATA/DIA

Comparison:	Mean Diff.:	Fisher PLSD:	Scheffe F-test:	Dunnett t:
CONTROL vs. TOPIC CONT...	7,725	1,976*	25,259*	10,052
CONTROL vs. TOPIC F 0.2%	7,565	1,976*	24,224*	9,844
CONTROL vs. TOPIC F 0.1...	8,78	1,976*	32,63*	11,424
CONTROL vs. TOPIC F+CA...	6,385	1,976*	17,256*	8,308
TOPIC CON... vs. TOPIC F ...	-,16	1,976	,011	,208

* Significant at 95%

tabla 17

One Factor ANOVA X 1: GRUPS TRACTAMENT Y 1: MENJAR/RATA/DIA

Comparison:	Mean Diff.:	Fisher PLSD:	Scheffe F-test:	Dunnett t:
TOPIC CON... vs. TOPIC F ...	1,055	1,976	,471	1,373
TOPIC CON... vs. TOPIC F...	-1,34	1,976	,76	1,744
TOPIC F 0.... vs. TOPIC F ...	1,215	1,976	,625	1,581
TOPIC F 0.... vs. TOPIC F+...	-1,18	1,976	,589	1,535
TOPIC F 0.... vs. TOPIC F+...	-2,395	1,976*	2,428	3,116

* Significant at 95%

tabla 18

II/ CONSUMO DE COMIDA:**II.1/ RESULTADOS:****- Representación gráfica (fig. n°2):**

En ella puede observarse en gramos, el consumo de comida por animal y día.

- Descripción estadística (tablas n°10 a 14):

Las tablas 10 a 14 nos muestran la descripción estadística detallada de cada grupo de estudio. Así, tenemos la media, la desviación estándar, el error estándar de la media, la varianza, el coeficiente de variación, el número de observaciones, los valores mínimo y máximo, el rango, la suma de los valores, la suma de los cuadrados, las pérdidas, los percentiles, la Kurtosis y el Skewness.

- Estadística comparativa (tablas n°15 a 18):

En las tablas n°15 y 16 tenemos una descripción de los grupos de estudio para aplicar una comparación de análisis de la varianza (ANOVA).

En las tablas n°17 y 18 observamos todas las comparaciones posibles entre los diferentes grupos de estudio.

II.2/ DISCUSION:

Al igual que en el caso del incremento de peso / peso inicial, se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el grupo **Control** y los otros cuatro grupos. También aquí, las explicaciones más probables para entender estas diferencias se centran en las distintas características de la dieta normal y la dieta cariogénica así como la administración de clomipramina.

Entre los cuatro grupos que han recibido dieta cariogénica, administración de clomipramina y tratamiento tópico, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el consumo de comida.

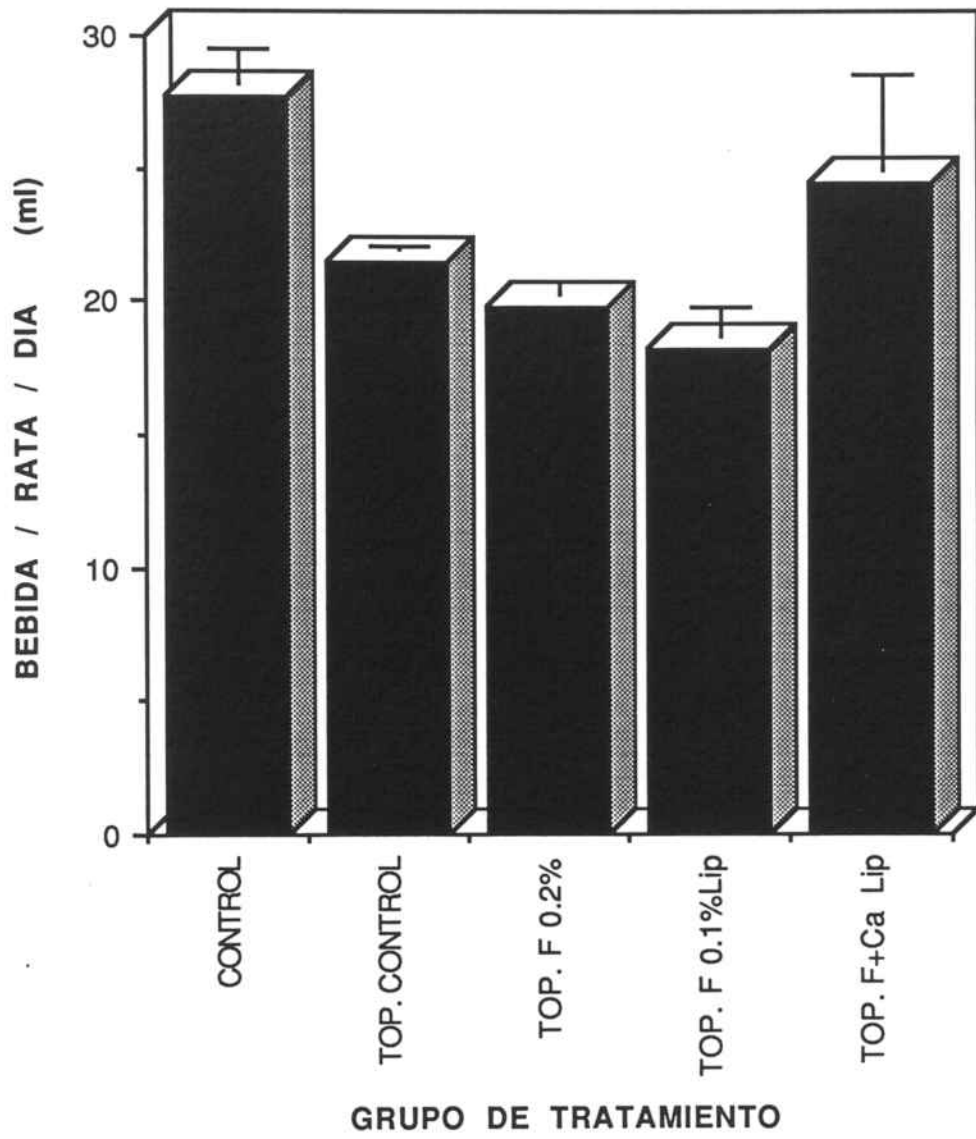


figura 3

X1: CONTROL - BEGUDA/RATA/DIA					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
27,72	1,881	1,33	3,538	6,785	2
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
26,39	29,05	2,66	55,44	1540,335	0
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
16,899	10,821	44,619	-2	0	

tabla 19

X2: TOPIC CONTROL - BEGUDA/RATA/DIA					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
21,475	,148	,105	,022	,691	2
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
21,37	21,58	,21	42,95	922,373	0
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
1,334	20,141	22,809	-2	0	

tabla 20

X3: TOPIC F 0.2% - BEGUDA/RATA/DIA					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
19,84	,707	,5	,5	3,564	2
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
19,34	20,34	1	39,68	787,751	0
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
6,353	13,487	26,193	-2	0	

tabla 21

X4: TOPIC F 0.1 % LIP - BEGUDA/RATA/DIA					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
18,23	1,457	1,03	2,122	7,99	2
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
17,2	19,26	2,06	36,46	666,788	0
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
13,087	5,143	31,317	-2	0	

tabla 22

X5: TOPIC F+CA LIP - BEGUDA/RATA/DIA					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
24,47	5,105	3,61	26,064	20,864	2
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
20,86	28,08	7,22	48,94	1223,626	0
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
45,869	-21,399	70,339	-2	0	

tabla 23

One Factor ANOVA X 1: GRUPS TRACTAMENT Y 1: BEGUDA/RATA/DIA

Analysis of Variance Table

Source:	DF:	Sum Squares:	Mean Square:	F-test:
Between groups	4	114,743	28,686	4,448
Within groups	5	32,246	6,449	p = ,0665
Total	9	146,989		

Model II estimate of between component variance = 11,118

tabla 24

One Factor ANOVA X 1: GRUPS TRACTAMENT Y 1: BEGUDA/RATA/DIA

Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
CONTROL	2	27,72	1,881	1,33
TOPIC CONTROL	2	21,475	,148	,105
TOPIC F 0.2%	2	19,84	,707	,5
TOPIC F 0.1 % LIP	2	18,23	1,457	1,03
TOPIC F+CA LIP	2	24,47	5,105	3,61

tabla 25

One Factor ANOVA X 1: GRUPS TRACTAMENT Y 1: BEGUDA/RATA/DIA

Comparison:	Mean Diff.:	Fisher PLSD:	Scheffe F-test:	Dunnett t:
CONTROL vs. TOPIC CONT...	6,245	6,529	1,512	2,459
CONTROL vs. TOPIC F 0.2%	7,88	6,529 *	2,407	3,103
CONTROL vs. TOPIC F 0.1...	9,49	6,529 *	3,491	3,737
CONTROL vs. TOPIC F+CA...	3,25	6,529	,409	1,28
TOPIC CON... vs. TOPIC F ...	1,635	6,529	,104	,644

* Significant at 95%

tabla 26

One Factor ANOVA X 1: GRUPS TRACTAMENT Y 1: BEGUDA/RATA/DIA

Comparison:	Mean Diff.:	Fisher PLSD:	Scheffe F-test:	Dunnett t:
TOPIC CON... vs. TOPIC F ...	3,245	6,529	,408	1,278
TOPIC CON... vs. TOPIC F...	-2,995	6,529	,348	1,179
TOPIC F 0.... vs. TOPIC F ...	1,61	6,529	,1	,634
TOPIC F 0.... vs. TOPIC F+...	-4,63	6,529	,831	1,823
TOPIC F 0.... vs. TOPIC F+...	-6,24	6,529	1,509	2,457

tabla 27

III/ CONSUMO DE BEBIDA:

III.1/ RESULTADOS:

- Representación gráfica (fig. n°23):

En ella puede observarse la cantidad de agua bebida en mililitros por rata y día.

- Descripción estadística (tablas n°19 a 23):

Las tablas n°19 a 23 nos muestran la descripción estadística detallada de cada grupo de estudio. Así, tenemos la media, la desviación estándar, el error estándar de la media, la varianza, el coeficiente de variación, el número de observaciones, los valores mínimo y máximo, el rango, la suma de los valores, la suma de los cuadrados, las pérdidas, los percentiles, la Kurtosis y el Skewness.

- Estadística comparativa (tablas n°24 a 27):

En las tablas n°24 y 25 tenemos una descripción de los grupos de estudio para aplicar una comparación de análisis de la varianza (ANOVA).

En las tablas n° 26 y 27 observamos todas las comparaciones posibles entre los diferentes grupos de estudio.

III.2/ DISCUSION:

Como cabría esperar tras el análisis de las variables incremento de peso / peso inicial y comida / rata / día, el grupo que más agua ha consumido es el **Control** aunque en este caso, las diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

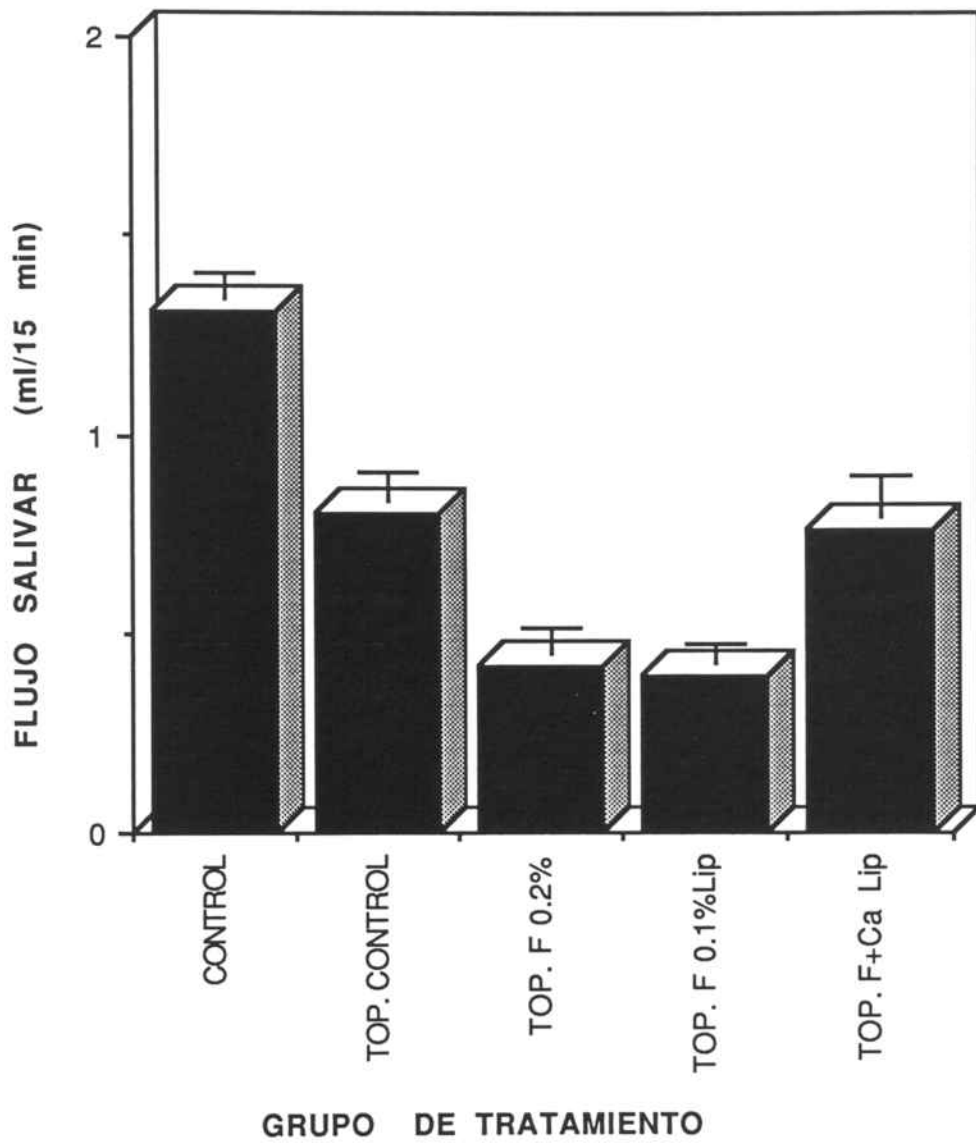


figura 4

X ₁ : CONTROL - Flux salival					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
1,307	,219	,069	,048	16,782	10
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
,96	1,63	,67	13,07	17,515	79
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
,157	1,15	1,464	-1,095	-,345	

tabla 28

X ₂ : TOPIC CONTROL - Flux salival					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
,804	,216	,068	,046	26,819	10
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
,4	1,05	,65	8,04	6,883	79
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
,154	,65	,958	-,637	-,812	

tabla 29

X ₃ : TOPIC F 0.2% - Flux salival					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
,419	,181	,06	,033	43,243	9
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
,18	,7	,52	3,77	1,842	80
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
,139	,28	,558	-1,185	,39	

tabla 30

X ₄ : TOPIC F 0.1%LIP - Flux salival					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
,39	,156	,055	,024	39,935	8
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
,17	,67	,5	3,12	1,387	81
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
,13	,26	,52	-,482	,41	

tabla 31

X ₅ : TOPIC F+CA LIP - Flux salival					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
,76	,27	,11	,073	35,56	6
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
,47	1,2	,73	4,56	3,831	83
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
,284	,476	1,044	-,851	,543	

tabla 32

One Factor ANOVA X 1: GRUP TRACTAMENT Y 1: Flux salival

Analysis of Variance Table

Source:	DF:	Sum Squares:	Mean Square:	F-test:
Between groups	4	5,154	1,288	29,691
Within groups	38	1,649	,043	p = ,0001
Total	42	6,802		

Model II estimate of between component variance = ,146

tabla 33

One Factor ANOVA X 1: GRUP TRACTAMENT Y 1: Flux salival

Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
CONTROL	10	1,307	,219	,069
TOPIC CONTROL	10	,804	,216	,068
TOPIC F 0.2%	9	,419	,181	,06
TOPIC F 0.1%LIP	8	,39	,156	,055
TOPIC F+CA LIP	6	,76	,27	,11

tabla 34

One Factor ANOVA X 1: GRUP TRACTAMENT Y 1: Flux salival

Comparison:	Mean Diff.:	Fisher PLSD:	Scheffe F-test:	Dunnett t:
CONTROL vs. TOPIC CONT...	,503	,189*	7,288*	5,399
CONTROL vs. TOPIC F 0.2%	,888	,194*	21,525*	9,279
CONTROL vs. TOPIC F 0.1...	,917	,2*	21,532*	9,28
CONTROL vs. TOPIC F+CA...	,547	,218*	6,464*	5,085
TOPIC CON... vs. TOPIC F ...	,385	,194*	4,047*	4,024

* Significant at 95%

tabla 35

One Factor ANOVA X 1: GRUP TRACTAMENT Y 1: Flux salival

Comparison:	Mean Diff.:	Fisher PLSD:	Scheffe F-test:	Dunnett t:
TOPIC CON... vs. TOPIC F ...	,414	,2*	4,389*	4,19
TOPIC CON... vs. TOPIC F...	,044	,218	,042	,409
TOPIC F 0.... vs. TOPIC F ...	,029	,205	,02	,285
TOPIC F 0.... vs. TOPIC F+...	-,341	,222*	2,413	3,107
TOPIC F 0.... vs. TOPIC F+...	-,37	,228*	2,704*	3,289

* Significant at 95%

tabla 36

IV/ FLUJO SALIVAR:**IV.1/ RESULTADOS:****_ Representación gráfica (fig. n°4):**

En ella puede apreciarse la cantidad de saliva secretada por rata en mililitros a lo largo de quince minutos.

- Descripción estadística (tablas n°28 a 32):

Las tablas n° 28 a 32 nos muestran la descripción estadística detallada de cada grupo de estudio. Así, tenemos la media, la desviación estándar, el error estándar de la media, la varianza, el coeficiente de variación, el número de observaciones, los valores mínimo y máximo, el rango, la suma de los valores, la suma de los cuadrados, las pérdidas, los percentiles, la Kurtosis y el Skewness.

- Estadística comparativa (tablas n° 33 a 36):

En las tablas n° 33 y 34 tenemos una descripción de los grupos de estudio para aplicar una comparación de análisis de la varianza (ANOVA).

En las tablas n° 35 y 36 observamos todas las comparaciones posibles entre los diferentes grupos de estudio.

IV.2/ DISCUSION:

Como era de esperar, existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el grupo **control** y los otros cuatro grupos probablemente como consecuencia de la administración efectuada a estos últimos de clomipramina.

Por otro lado, las cantidades recogidas en el caso de estos cuatro grupos no son similares entre sí, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre la secreción de:

- **Topic control y Topic F 0,2%.**
- **Topic control y Topic F 0,1% lip.**
- **Topic F 0,1% lip y Topic F+Ca lip.**

Sin embargo, estas medidas deberían comprobarse en posteriores estudios ya que la metodología empleada está sujeta a posibles perfeccionamientos destinados a reducir la mortalidad registrada a lo largo del período de tiempo destinado a la recogida de la saliva.

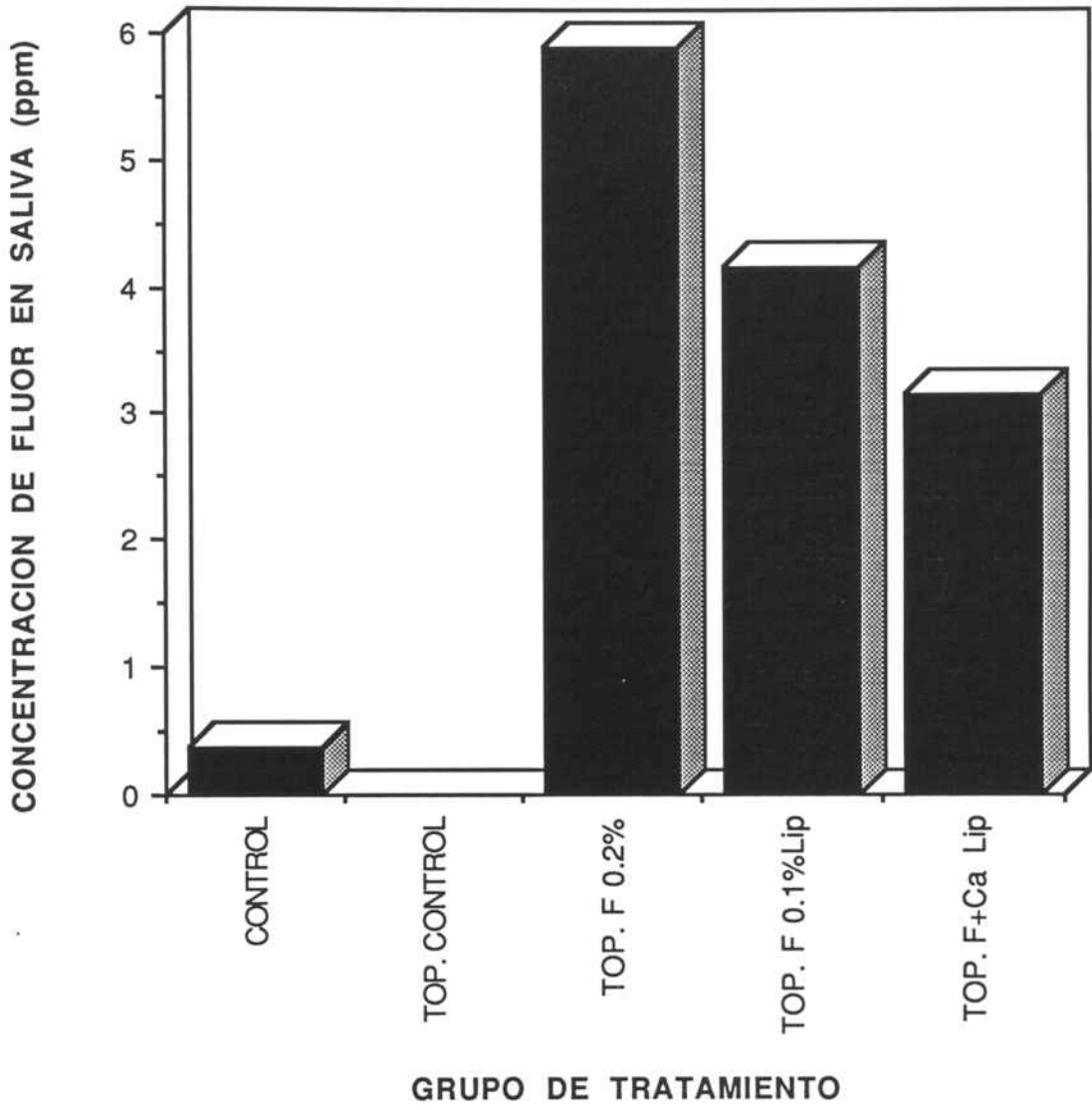


figura 5

X ₁ : CONTROL - FLUOR SALIVA					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
,388	•	•	•	•	1
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
,388	,388	0	,388	,151	15

tabla 37

X ₂ : TOPIC CONTROL - FLUOR SALIVA					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
0	•	•	•	•	1
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
0	0	0	0	0	15

tabla 38

X ₃ : TOPIC F 0.1 % LIP - FLUOR SALIVA					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
4,162	•	•	•	•	1
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
4,162	4,162	0	4,162	17,322	15

tabla 39

X ₄ : TOPIC F 0.2% - FLUOR SALIVA					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
5,904	•	•	•	•	1
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
5,904	5,904	0	5,904	34,857	15

tabla 40

X ₅ : TOPIC F+CA LIP - FLUOR SALIVA					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
3,169	•	•	•	•	1
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
3,169	3,169	0	3,169	10,043	15

tabla 41

V/ CONCENTRACION DE FLUOR EN SALIVA:

V.1/ RESULTADOS:

- Representación gráfica (fig. nº 5):

Se aprecia en ella la concentración hallada de flúor en saliva en ppm en los 5 grupos de tratamiento mediante una técnica realizada con electrodo de flúor en el Servei Científico-Tècnic de la Universitat de Barcelona descrita en el apartado de *Material y métodos*.

- Descripción estadística (tablas nº 37 a 41):

Las tablas nº 37 a 41 nos muestran la descripción estadística detallada de cada grupo de estudio. Pero en este caso, al tener un solo dato para cada grupo de tratamiento tan sólo presentamos la media, el número de observaciones, los valores mínimo y máximo, el rango, la suma de los valores, la suma de los cuadrados y las pérdidas.

- Estadística comparativa.

En este caso no se ha realizado pues sólo disponemos de un valor por grupo de tratamiento ya que como hemos señalado, la determinación se efectuó agrupando la saliva de todos los animales de un mismo grupo.

V.2/ DISCUSION:

Como podíamos esperar, la presencia de flúor en saliva es mucho mayor en los tres grupos que han recibido un tratamiento tópico con algún preparado de flúor. En los otros dos grupos, el **Control** y el **Topic control**, la presencia de flúor en saliva es mínima (0,388ppm) en el primero y nula en el segundo.

En lo referente a la presencia de flúor en la saliva de los tres grupos que han recibido flúor tópico, ésta es mayor (5,904 ppm) en el grupo que ha recibido el aporte de flúor en forma de fluoruro sódico al 0,2%.

Sin embargo, el valor alcanzado cuando se ha utilizado fluoruro sódico liposomado (4,162 ppm) resulta ciertamente esperanzador teniendo en cuenta que en este caso la concentración utilizada era de 0,1%.

Por otro lado, la reconocida capacidad de los liposomas para efectuar una liberación retardada de los principios activos en ellos incluidos nos permite pensar que tal vez, si esta medición de flúor en saliva se hubiese efectuado transcurrido un mayor lapso de tiempo tras la administración del tratamiento tópico, la concentración hallada en el grupo tratado con flúor liposomado habría sido más pareja o incluso superior a la hallada en el grupo tratado con fluoruro sódico al 0,2 %.

En cierto modo, esta hipótesis se vería fortalecida por el hecho de que, como veremos más adelante, la incidencia de caries en el grupo tratado con flúor liposomado sea inferior a la del grupo que ha recibido flúor sin liposomar a pesar de que en esta último, la concentración de flúor en saliva durante los primeros 15 minutos sea superior.

Sin duda, resultaría interesante efectuar posteriores estudios en los que se comprobase si efectivamente tras la administración de manera tópica de flúor liposomado, la concentración de flúor en los fluidos orales permanece elevada durante un lapso de tiempo mayor.

Igualmente, debería comprobarse si ésta sería la única circunstancia que determinase la menor incidencia de caries registrada en el grupo tratado con el flúor liposomado. Así por ejemplo, las propiedades físicoquímicas de los liposomas tal vez determine una mayor penetrabilidad del flúor en las estructuras adamantinas.

En el grupo al que se le ha administrado los preparados liposomales de cloruro cálcico y fluoruro sódico, la concentración de flúor hallada, si bien es importante (3,169 ppm), no resulta tan elevada como la que se ha registrado para los otros dos grupos que han recibido administración tópica de flúor ya sea en forma libre o liposomada. Ello puede ser debido al hecho de que no se haya respetado un lapso de tiempo suficiente entre la administración de los dos preparados, circunstancia que puede haber facilitado una posible precipitación de estos componentes dando lugar a una sal que no sería registrada por el electrodo de flúor. En cualquier caso, no hemos de olvidar que en este grupo sólo se pudo disponer de la saliva de seis animales.

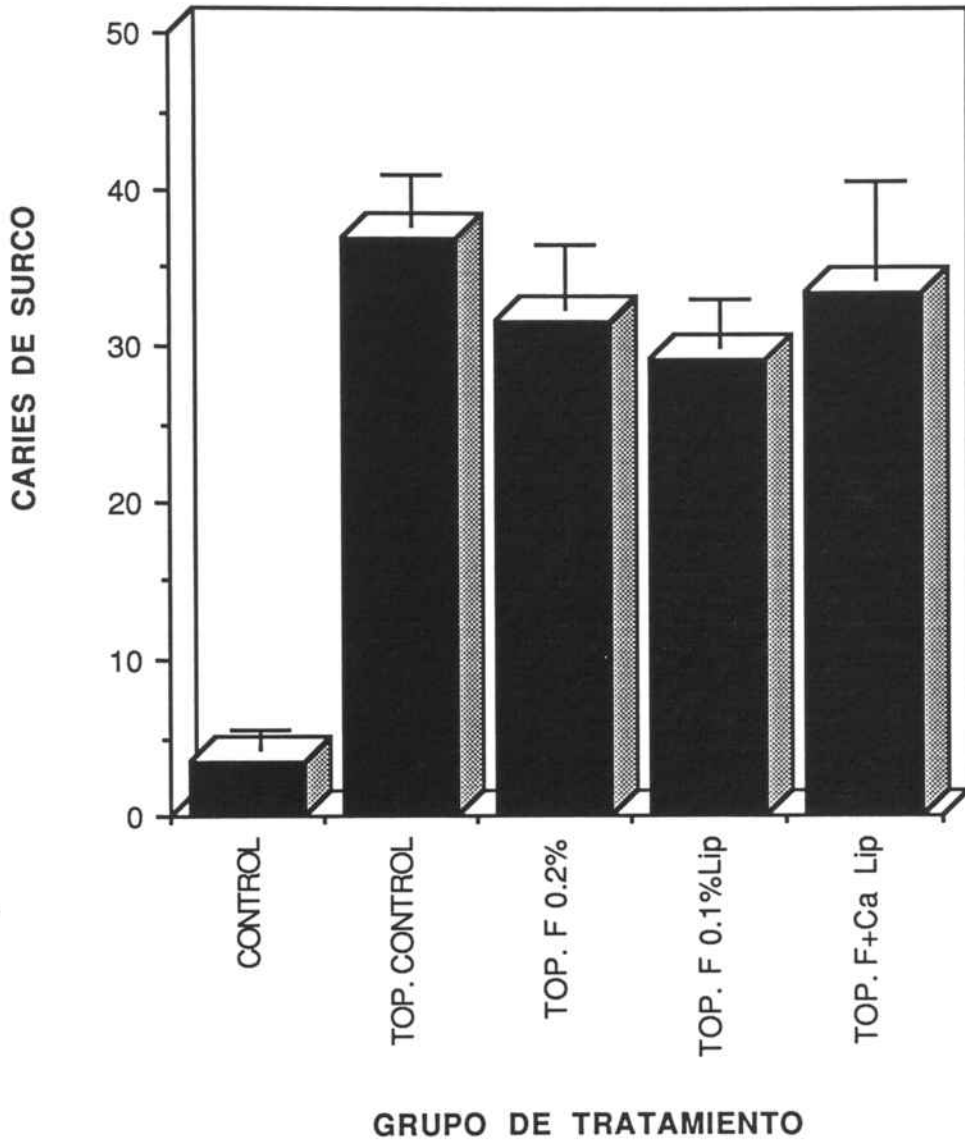


figura 6

X1: CONTROL - CARIES DE SURCO					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
3,5	3,689	1,167	13,611	105,409	10
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
0	9	9	35	245	0
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
2,64	,86	6,14	-1,44	,406	

tabla 42

X2: NO FLUOR - CARIES DE SURCO					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
36,965	10,535	3,331	110,981	28,499	10
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
20,33	53,33	33	369,65	14662,94	0
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
7,537	29,428	44,502	-,836	,351	

tabla 43

X3: FNa 0.2% topic - CARIES DE SURCO					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
31,703	12,273	4,091	150,619	38,711	9
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
10	47,67	37,67	285,33	10250,862	1
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
9,435	22,269	41,138	-,82	-,258	

tabla 44

X4: FNa lip 0.1% topic - CARIES DE SURCO					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
29,259	8,872	2,957	78,715	30,323	9
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
12	46	34	263,33	8334,467	1
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
6,821	22,438	36,079	,823	-,054	

tabla 45

X5: F+Ca lip - CARIES DE SURCO					
Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:	Variance:	Coef. Var.:	Count:
33,374	18,163	6,422	329,898	54,423	8
Minimum:	Maximum:	Range:	Sum:	Sum of Sqr.:	# Missing:
12,67	65,67	53	266,99	11219,742	2
t 95%:	95% Lower:	95% Upper:	Kurtosis:	Skewness:	
15,187	18,187	48,56	-,698	,792	

tabla 46

One Factor ANOVA X 1: TRACTAMENT Y 1: CARIES DE SURCO

Analysis of Variance Table

Source:	DF:	Sum Squares:	Mean Square:	F-test:
Between groups	4	7075,288	1768,822	13,774
Within groups	41	5265,286	128,422	p = ,0001
Total	45	12340,575		

Model II estimate of between component variance = 178,6

tabla 47

One Factor ANOVA X 1: TRACTAMENT Y 1: CARIES DE SURCO

Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
CONTROL	10	3,5	3,689	1,167
NO FLUOR	10	36,965	10,535	3,331
FNa 0.2% topic	9	31,703	12,273	4,091
FNa lip 0.1% topic	9	29,259	8,872	2,957
FNa 0.1% + ClCa ...	8	33,374	18,163	6,422

tabla 48

One Factor ANOVA X 1: TRACTAMENT Y 1: CARIES DE SURCO

Comparison:	Mean Diff.:	Fisher PLSD:	Scheffe F-test:	Dunnett t:
CONTROL vs. NO FLUOR	-33,465	10,236*	10,901*	6,603
CONTROL vs. FNa 0.2% to...	-28,203	10,517*	7,335*	5,417
CONTROL vs. FNa lip 0.1...	-25,759	10,517*	6,119*	4,947
CONTROL vs. FNa 0.1% + ...	-29,874	10,857*	7,721*	5,557
NO FLUOR vs. FNa 0.2% t...	5,262	10,517	,255	1,011

* Significant at 95%

tabla 49

One Factor ANOVA X 1: TRACTAMENT Y 1: CARIES DE SURCO

Comparison:	Mean Diff.:	Fisher PLSD:	Scheffe F-test:	Dunnett t:
NO FLUOR vs. FNa lip 0.1...	7,706	10,517	,548	1,48
NO FLUOR vs. FNa 0.1% +...	3,591	10,857	,112	,668
FNa 0.2% t... vs. FNa lip ...	2,444	10,79	,052	,458
FNa 0.2% t... vs. FNa 0.1...	-1,67	11,122	,023	,303
FNa lip 0.1... vs. FNa 0.1...	-4,115	11,122	,14	,747

tabla 50

VI/ CARIES DE SURCO:

VI.1/ Resultados:

- Representación gráfica (fig. n° 6):

En ella puede observarse el valor atribuido a cada grupo en función de la medición de caries de surco efectuada siguiendo la modificación de la técnica de Keyes que hemos explicado en el apartado de *Material y Métodos*. Recordamos que los datos se han obtenido mediante la media de las tres observaciones efectuadas.

- Descripción estadística (tablas n° 42 a 46):

Las tablas n° 42 a 46 nos muestran la descripción estadística detallada de cada grupo de estudio. Así, tenemos la media, la desviación estándar, el error estándar de la media, la varianza, el coeficiente de variación, el número de observaciones, los valores mínimo y máximo, el rango, la suma de los valores, la suma de los cuadrados, las pérdidas, los percentiles, la Kurtosis y el Skewness.

- Estadística comparativa (tablas n° 46 a 50):

En la tabla n° 47 y 48 tenemos una descripción de los grupos de estudio para aplicar una comparación de análisis de la varianza (ANOVA).

En las tablas n° 49 y 50 observamos todas las comparaciones posibles entre los diferentes grupos de estudio.

VI.2/ DISCUSION:

Como era de esperar, y concordando con los resultados obtenidos en anteriores estudios efectuados en este departamento (36 y 37), en el grupo **Control**, al no haberse favorecido ningún factor cariogénico, prácticamente no se observan lesiones de caries de surco lo cual determina unas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con los otros cuatro grupos.

Por el contrario, en el grupo **Topic control**, al haberse favorecido las condiciones cariogénicas y no haberse adoptado ninguna medida preventiva (los enjuagues se efectuaban con agua corriente) los niveles de caries de surco hallados son los mayores de los cinco grupos que componen el estudio.

En lo que concierne a los tres grupos sometidos a condiciones cariogénicas y que recibían algún tipo de tratamiento tópico de flúor, se registran unos valores de caries inferiores a los hallados en el grupo **Topic Control**, siendo el grupo con menos caries el tratado con **flúor liposomado en una concentración de 0,1%**. Si bien esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p < 0,05$), debe destacarse la baja concentración empleada en el caso de la inclusión del flúor en liposomas.

En cuanto al grupo que recibía el **pretratamiento de cloruro cálcico** es, de los tres grupos que han recibido un tratamiento de flúor tópico, el que ha registrado unos niveles de caries superiores. A pesar de ello, el valor hallado resulta inferior al del grupo **Topic Control**.

Pensamos que al igual que hemos dicho en el caso de la concentración de flúor en saliva, esta menor protección aportada en el caso del flúor liposomado cuando la pieza ha recibido un pretratamiento a base de cloruro cálcico también liposomado, puede ser debida a la precipitación de estos componentes como resultado del escaso lapso de tiempo transcurrido entre las dos aplicaciones.

VII/ CONCLUSIONES.

1/ Comparando los resultados obtenidos en el grupo que ha recibido fluoruro sódico sin liposomar y los obtenidos en el grupo que ha recibido fluoruro sódico liposomado en lo que se refiere tanto a la concentración de flúor en saliva como al recuento de caries, parece justificado nuestro optimismo respecto de las posibilidades del flúor liposomado sobre todo si tenemos en cuenta que la concentración utilizada en el caso del fármaco liposomado era la mitad de la empleada en su forma libre.

Asimismo, no debemos olvidar que el grupo tratado con fluoruro sódico sin liposomar constituye un grupo que podríamos denominar "control positivo" pues su capacidad cariostática está ampliamente reconocida.

Por todo ello, creemos indicado el proseguir esta línea de trabajo intentando aumentar la concentración de principio activo liposomado así como incrementando el número de efectivos de las muestras.

2/ En el caso de la combinación de la administración de cloruro cálcico liposomado y fluoruro sódico liposomado, creemos que debería aumentarse el lapso de tiempo entre la aplicación de ambos preparados con el fin de evitar una posible precipitación de ambos componentes.

3/ Teniendo en cuenta las concentraciones de flúor halladas en la saliva recogida durante los 15 minutos posteriores a la administración de los preparados tópicos, pensamos que este método de administración experimental de flúor tópico queda plenamente validado.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Bjornstrom M., Axell T. Comparison between saliva atimulants and saliva substitutes in patients with symptoms related to dry mouth. Sweed. Dent. J. 1990; 14: 153-61.
- (2) Nikiforuk G. Caries dental: aspectos básicos y clínicos. Buenos Aires. Mundi. 1986;
- (3) Thylstrup A., Fejerskov. Caries. Barcelona. Doyma Sa. 1988; 15-21.
- (4) Leach, Connell R. Reversal of fissure caries in the albino rat by stimulating salivary flow with pilocarpine. Caries Res 1990; 24: 127-129.
- (5) Ooshima T, Hashida T, Fuchichata H y cols. Dental caries induction in hyposalivate rats. Caries res 1991; 25: 138-142.
- (6) Newbrun E. Cariología. México. Editorial Limusa S.A. 1984; 39-50.
- (7) Goth A. Farmacología médica. Barcelona. Ed. Doyma. 1986; 249-259.

- (8) Bochner F., Carruthers G., Kampmann J., Steiner J. Manual de farmacología clínica. Barcelona. Salvat Editores S.A. 1980; 261-263.
- (9) Flórez J., Armijo J.A., Mediavilla A. Farmacología humana. Iruña. Eunsa. 1987; 382-403. Larsen M.J. Chemical Events during tooth dissolution. J. Dent. Res. 1990; 69: 575-580).
- (10) Larsen M.J. Chemical Events during tooth dissolution. J. Dent. Res. 1990; 69: 575-580.
- (11) Cuenca E., Manau C., Serra Ll. Manual de odontología preventiva y comunitaria. St. Adrià del Besòs (Barcelona). Masson s.a. 1991; 68-75.
- (12) Krasse B. Caries risk. Chicago. Quintessence publishong. 1985; 59-74.
- (13) Wei Stephen H.Y. Les utilisations cliniques des fluorures. Problemes actuels en odontologie clinique 1. London-Paris. John Libbey Eurotext 1986; 59-181.
- (14) Murray J.J., Rugg-Gun A.J., Jenkins G.N. Fluorides in caries prevention. Oxford. Butterworth-Heinemann Ltd. 1991; 295-324.
- (15) Creath C.J., Eick J.D., Hicks E.P. Effect of Systemic Fluoride on Rat Molar Morphology. Caries Res 1989 23: 26-31.

- (16) Kortelainen S., Larmas M.. Effects of low and high fluoride levels on rat dental caries and simultaneous dentine apposition. *Archs. oral biol.* 1990; 3: 229-234.
- (17) Larson R.H., Mellberg J.R., Englander H.R., Senning R. Caries inhibition in the rat by water-borne and enamel-bound fluoride. *Caries res.* 1976; 10: 321-331.
- (18) Mirth D.B., Adderly Donna D. y cols. Comparison of the cariostatic effect of topically and systemically administered controlled-release fluoride in the rat. *Caries res.* 1985; 19: 466-474.
- (19) Maierhofer, G. Liposomas. Introducción a una nueva tecnología y descripción de técnicas preparativas. *Farmacia clínica* 1988; 9: 658-680.
- (20) Vila J.L., Seijo B., Alonso M.j., Torres D. Modernos métodos de administración de medicamentos. Madrid. *Farmaindustria.* 1990; 37-107.
- (21) Ostro Marc J. Liposomas. Fondo bibliográfico de Investigación y ciencia. Marzo, 1987.
- (22) Weatherel J.A., Robinson C., Best J.S. Influence of anatomical site on fluoride levels in rat molars. *Caries Res* 1981; 15:386-392.

- (23) Shern R.J., Mirth D.B. Effects of an acidic calcium phosphate solution and the intraoral fluoride-releasing device on dental caries and fluoride uptake in rats. *Caries res.* 1991; 25: 268-276.
- (24) Edgar W.M., Bowen W.H. y cols. Effects on caries in rats of calcium glycerophosphate and sodium fluoride administered together and separately. *Caries res.* 1981; 15: 512-514.
- (25) Shern R.J., Chow L.C. Effects of flushings with an acidic calcium phosphate solution on fluoride binding and caries in rat teeth. *Caries res.* 1987; 21: 435-444.
- (26) Rölla G., Saxegaard E. Critical Evaluation of the Composition and Use of Topical Fluorides, with Emphasis on the Role of Calcium Fluoride in Caries Inhibition. *J. Dent. Res.* 1990; 69:780-785.
- (27) Ooshima T., Hashida T. y cols. Effect of experimental hyposalivation on the induction of dental caries in rats infected with *Streptococcus Mutans*. *Caries res.* 1990; 24:446-451.
- (28) Navia J.M. Animals models in dental research. Birmingham. The university of Alabama press. 1977; 168-283.
- (29) König K.G., Marthaler T.M. y cols. Methodik der kurzfristig erzeugten rattenkaries. *Dtsch Zahn Mund Kieferheilk* 1958; 29: 99-127.

- (30) Keyes Paul H. Dental caries in the molar teeth of rats. *J.D. Res* 1958; 6:1089-1099.
- (31) Beiraghi S., Spuller R. y cols. Effect of low-level fluoride and caries incidence in rats. *Caries res.* 1989; 23: 168-171.
- (32) Hafström-Björkman U., Sundström F. y cols. Initial caries diagnosis in rat molars using laser fluorescence. *Acta Odontol. Scand.* 1991; 49: 27-33.
- (33) Rafferty J., Norling R. y cols. StatWorks™. Versión 1.1. London. Cricket software. 1985.
- (34) Feldman D., Gagnon J. y cols. StatView™ SE+Graphics. Versión 1.03. Berkeley. Abacus concepts inc. 1988.
- (35) Galindo M.P. Exposición intuitiva de métodos estadísticos. Citado por Departamneto de Ecología. Facultad de Biología. Universidad de Salamanca. 1984.
- (36) Martínez J. Psicofàrmacs com a factor cariogènic en la rata. Prevenció amb flúor sistèmic. Trabajo fin de licenciatura. Facultat d' Odontologia U.B. 1991.
- (37) Guillen P. Prevenció amb flúor de la caries experimental potenciada amb psicofàrmacs. Trabajo fin de licenciatura. Facultat d' Odontologia U.B. 1992.