

Efecto de colutorios de xilitol/clorhexidina versus xilitol o clorhexidina sobre la formación inicial de la biopelícula de estreptococos cariogénicos

Eva-Maria DecKer, PhD^a, Gabriele Maier^b, Detlef Axmann, PhD^c, Michel Brex, Prof.^d, y Christiane von Ohle, DMD^e

Objetivos: Las bacterias orales que poseen resistencias naturales deterioran la eficacia antibacteriana de la clorhexidina sobre los microorganismos cariogénicos. El xilitol, casi siempre aplicado en forma de chicles, posee buenas propiedades para la reducción de placa. El propósito de este estudio fue investigar el efecto de colutorios de xilitol formulados como solución pura o en combinación con clorhexidina sobre la viabilidad de *Streptococcus sanguis* (primer colonizador de los dientes humanos) y de *Streptococcus mutans* (la cepa principalmente responsable de la caries) durante las fases iniciales de formación de la biopelícula.

Método y materiales: Tras la exposición a las soluciones de prueba, se dejó que las bacterias suspendidas en saliva estéril humana se adhirieran a láminas de esmalte humano durante 60 min en un sistema preclínico de cámara de flujo. Se monitorizó la vitalidad de las bacterias de las células suspendidas y adheridas empleando 2 cepas DNA fluorescentes mediante microscopio de

epifluorescencia. Otros parámetros que se midieron fueron los recuentos celulares totales de bacterias sobre las láminas de esmalte y el crecimiento de los estreptococos suspendidos.

Resultados: La sensibilidad de *S. mutans* a la clorhexidina pura o en combinación con xilitol se contraponen a la resistencia natural de *S. sanguis* a la clorhexidina. La combinación de xilitol/clorhexidina mostró un efecto bactericida estadísticamente significativo sobre las células de *S. sanguis* comparado con los agentes puros (xilitol y clorhexidina). La densidad celular bacteriana sobre el esmalte y la reproducción bacteriana sobre placas de agar se vieron afectadas de forma similar por la combinación de xilitol/clorhexidina o las sustancias puras.

Conclusión: El efecto bactericida sinérgico descubierto del xilitol combinado con la clorhexidina permitirá el uso potencial de xilitol para mejorar nuevas composiciones de los colutorios de prevención de caries.

(*Quintessenz Int.* 2008;39(1):17-22)

^aCientífico Investigador Senior. Departamento de Odontología Conservadora. Facultad de Medicina Dental. Universidad de Tübingen. Tübingen, Alemania.

^bTécnico. Departamento de Odontología Conservadora. Facultad de Medicina Dental. Universidad de Tübingen. Tübingen, Alemania.

^cEstadístico Clínico Senior. Departamento de Odontología Conservadora. Facultad de Medicina Dental. Universidad de Tübingen. Tübingen, Alemania.

^dProfesor. Departamento de Odontología Conservadora. Facultad de Medicina Dental. Universidad de Tübingen. Tübingen, Alemania.

^eJefe Clínico Senior. Departamento de Odontología Conservadora. Facultad de Medicina Dental. Universidad de Tübingen. Tübingen, Alemania.

Correspondencia: Dra. Eva-Maria Decker.

Abteilung Poliklinik für Zahnerhaltung, ZMK-Klinik.

Osianderstrasse 2-8, D 72076 Tübingen, Alemania.

Correo electrónico: Evi.Decker@med.uni-tuebingen.de

El xilitol es un sustituto natural del azúcar no cariogénico que no puede ser metabolizado por las bacterias orales aunque sea administrado durante años¹. Este polialcohol posee distintas propiedades favorables para la prevención de la caries. Su acción inhibidora del crecimiento de *Streptococcus mutans* en la saliva y en la placa parece basarse en el establecimiento de un ciclo estéril de consumo de energía intracelular, que rompe la cadena energética del fosfato²⁻⁴. La captación de xilitol dentro de la célula mediante el sistema de transporte específico de la fructosa, fosfoenolpiruvato, conduce mediante fosforilación al xilitol-5-fosfato. El polialcoholfosfato se convierte en xilulosefosfato, que a su vez es defosforilado y expulsado de la célula^{5,6}.

Además de la inhibición de la glicólisis, el xilitol reduce la cantidad de polisacáridos adherentes extracelulares y de ácidos lipoteicoicos, lo que conduce a la formación de unas biopelículas muy débilmente unidas a las superficies dentarias⁷. Otro de los elementos valiosos en la prevención de la caries es la inhibición de fuerte descenso del pH durante la fermentación de la glucosa que ocurre en presencia de xilitol. Son varios los estudios que han versado sobre los efectos clínicos del xilitol en la reducción de la caries. A pesar de que la clorhexidina es el antiséptico de referencia su eficacia puede verse disminuida por la presencia de bacterias con resistencias naturales frente a este agente, como el *Streptococcus sanguis*^{8,9}. En la cavidad oral coexisten varias formas celulares microbianas fisiológicamente diferentes; de este modo coexisten bacterias de crecimiento muy activo con células latentes sin actividad metabólica¹⁰.

Casi todos los estudios in vivo que se realizan con xilitol emplean chicles, lo que produce una mezcla de forma muy confusa de los efectos fisicoquímicos y mecánicos. Por ello, el propósito de este estudio fue investigar los efectos puramente fisicoquímicos de colutorios de xilitol sobre la viabilidad de *S sanguis*, como uno de los primeros colonizadores cariogénicos representativo de los dientes humanos, y de *S mutans*, el microorganismo principalmente responsable de la caries humana, respecto a su viabilidad y adhesión a láminas de esmalte humano dentro de un sistema preclínico de cámara de flujo. Se trataba de comparar el impacto de una solución de xilitol/clorhexidina sobre la viabilidad de los estreptococos con el de un colutorio puro de xilitol con la clorhexidina como control positivo.

Método y materiales

Se investigaron mediante el sistema de cámara de flujo, descrito con detalle en un reciente estudio¹¹ (fig. 1), los

efectos de los colutorios de prueba de xilitol (ZIL, 4%) y ZIL (4%) con clorhexidina (CHX, 0,1%) en comparación con los del colutorio control positivo de CHX (0,1%) y los del control negativo, suero salino fisiológico (Nac.) sobre células *S sanguis* y *S mutans* suspendidas en un medio líquido (N.º 260068 y N.º 20523, Colección Alemana de Microorganismo y Cultivos Celulares) y su adhesión.

De forma breve, la cámara de flujo albergaba el sustrato de adhesión montado en paralelo, esmalte humano, y la suspensión ambiental consistente en saliva humana estéril y estreptococos. La tasa de flujo de la suspensión en la cámara de flujo fue de 0,8 ml/min, simulando un flujo salivar medio. La saliva humana estéril fue obtenida de un voluntario sano mediante estimulación con parafina seguida de centrifugación (25, 524 g durante 30 min a 3 °C; Biofuge 22 R, Heraeus Kulzer) y filtración de la saliva con 2 filtros de bajo enlace a proteínas (0,45 µm y 0,22 µm; Milipore).

Se cultivaron los estreptococos en medio de Schaedler (Becton Dickinson) durante 18 h a 37 °C, se lavaron con NaCl, y se expusieron a los colutorios de prueba durante dos minutos. Después, las bacterias lavadas se suspendieron en saliva humana estéril y se colocaron en una cámara de flujo para que se adhirieran a esmalte durante 60 min bajo las condiciones de células en reposo. La viabilidad de los microbios indicada por el porcentaje de estreptococos vitales adheridos (%EV_a), y los recuentos celulares bacterianos totales adheridos al sustrato (RB_a) se valoraron mediante microscopio de fluorescencia empleando Syto 9 (Invitrogen-Molecular Probes) e yoduro de propidium para diferenciar las células verdes vitales de las rojas muertas¹². La viabilidad del cultivo se determinó por siembra espiral y cultivo de los estreptococos suspendidos (unidades formadores de colonia) durante 48 h a 37 °C.

Se realizaron diez series de cada modelo quimioterapéutico. Los valores de UFC y de RB_a se trans-

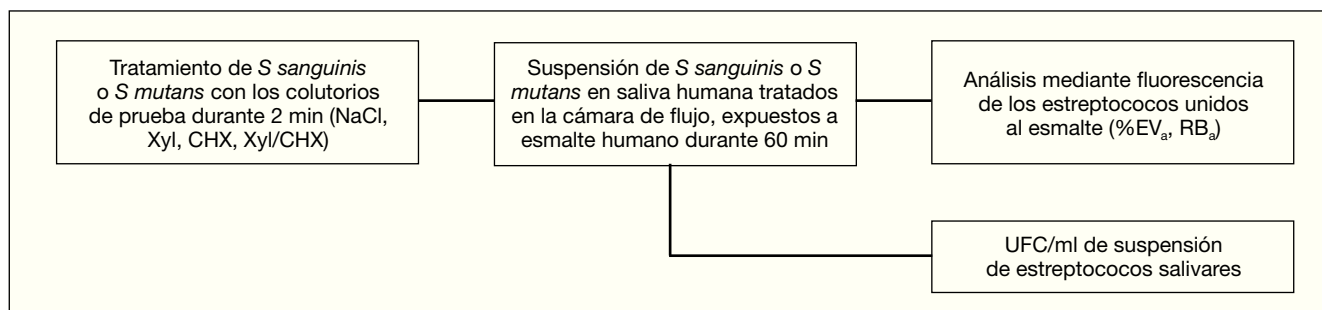


Figura 1. Esquema del diseño del estudio.

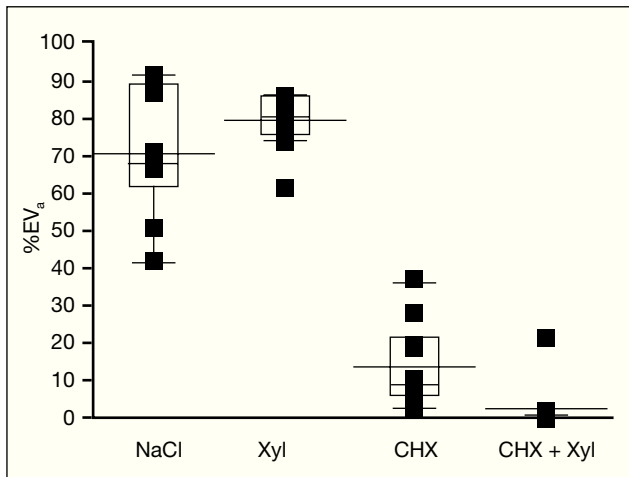


Figura 2a. Porcentaje de células vitales *S. sanguis* unidas a esmalte (%EV_a) tras el tratamiento de suspensión en medio clínico con los 4 colutorios de prueba, mostrados en el gráfico como cuadrados con percentiles de 25%, 50%, y 75%, y con las líneas de medias.

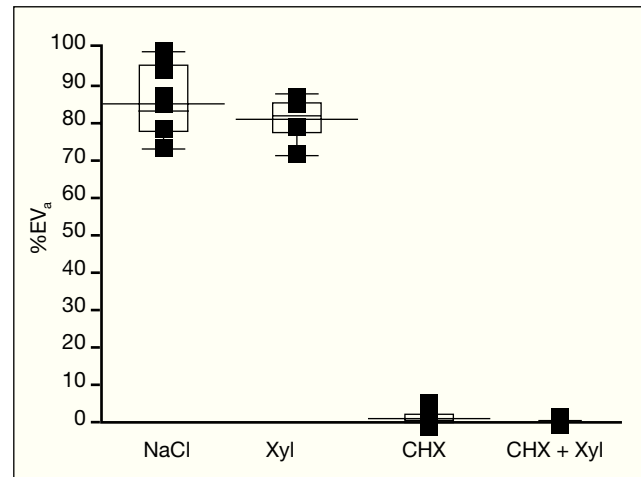


Figura 2b. Porcentaje de células *S. mutans* unidas al esmalte (%EV_a) tras el tratamiento de suspensión en medio líquido con los 4 colutorios de prueba, mostrados en el gráfico como cuadrados con percentiles de 25%, 50%, y 75%, y con las líneas de medias.

formaron en logaritmos de base decimal. La distribución de los datos de cada variable cuantitativa se valoró mediante un diagrama normal de probabilidades. En él se vio que los datos no presentaban una distribución normal. Por ello, para comprobar si había diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, se empleó la prueba no paramétrica H de Kruskal-Wallis con el fin de comparar las distribuciones correspondientes. Como de costumbre, el nivel de significación se estableció a 0,05. Para evitar una tasa de error global tipo I debida a múltiples comparaciones, el nivel de significación se modificó dividiendo 0,05 por el número de comparaciones realizadas (corrección de Bonferroni).

Resultados

El xilitol parece favorecer la vitalidad microbiana de *S. sanguis* adherido a esmalte (aproximadamente un 79%) comparado con el control negativo (aproximadamente un 70%) (fig. 2a). *S. mutans* fue sensible a la CHX pura (%EV_a sobre el esmalte, aproximadamente 0%) (fig. 2b), mientras que *S. sanguis* reveló una mayor resistencia a la CHX (%EV_a sobre el esmalte, 14%) (ver fig. 2a). Comparada con la CHX pura, la combinación de Xyl/CHX mostró un efecto bactericida estadísticamente significativo sobre las células de *S. sanguis* unidas al esmalte, con valores cercanos al cero (2,5%).

Respecto a la densidad bacteriana de los estreptococos unidos al esmalte tras la exposición microbiana a los tres

colutorios de prueba (Xyl, CHX y Xyl/CHX), los valores logarítmicos de los recuentos celulares bacterianos totales se redujeron moderadamente a un nivel similar al del control negativo (figs. 3a y 3b).

Las unidades formadoras de colonia por mililitro, suspendidas en medio clínico, de los estreptococos tratados con NaCl y xilitol fueron del mismo orden de magnitud (log UFC aproximadamente 8,0) (figs. 4a y 4b). El crecimiento de *S. sanguis* fue reducido por la CHX a 0,8 unidades de log₁₀ (fig. 4a). El efecto antibacteriano significativo más elevado se observó después de la exposición a CHX, disminuyendo los valores del log₁₀ de UFC/ml de las células de *S. mutans* de forma significativa en aproximadamente 2,5 unidades log (fig. 4b). La inhibición del crecimiento de *S. sanguis* y *S. mutans* tras el contacto con el colutorio de Xyl/CHX tiende a ser menor que tras el contacto con CHX pura, aunque la diferencia no es significativa.

Discusión

El presente estudio se centró en el efecto fisicoquímico puro de un colutorio acuoso de xilitol formulado como solución pura o en combinación con CHX sobre los estreptococos cariogénicos, excluyendo las interacciones mecánicas. La mayoría de los estudios dentales/médicos y nutricionales sobre el xilitol se han realizado con chicles de goma, basándose en el hecho de que más del 96% del consumo de xilitol se hace en forma de chicles de goma¹³.

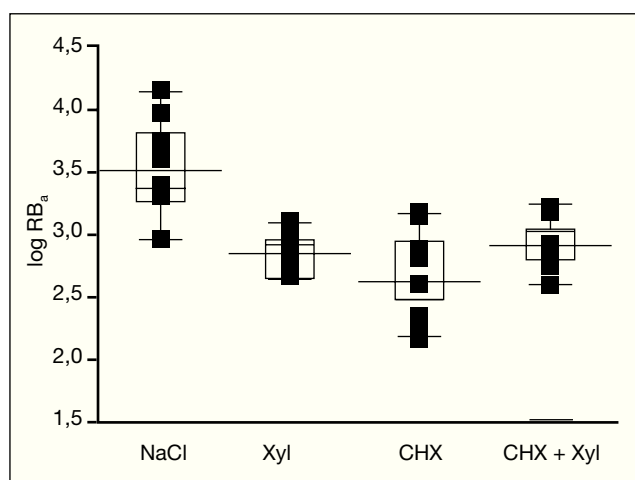


Figura 3a. Valores logarítmicos del total de células bacterianas de *S. sanguis* unidas al esmalte ($\log RB_a$) tras el tratamiento de suspensión en medio líquido con los 4 colutorios de prueba, mostrados en el gráfico como cuadrados con percentiles de 25%, 50%, y 75%, y con las líneas de medias.

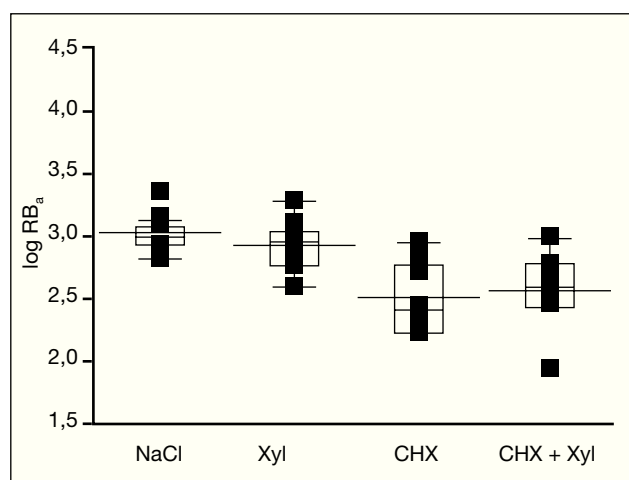


Figura 3b. Valores logarítmicos del total de células bacterianas de *S. mutans* unidas al esmalte ($\log RB_a$) tras el tratamiento de suspensión en medio líquido con los 4 colutorios de prueba, mostrados en el gráfico como cuadrados con percentiles de 25%, 50%, y 75%, y con las líneas de medias.

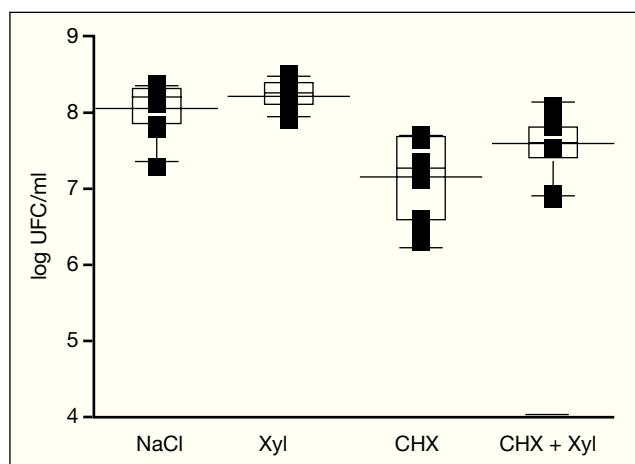


Figura 4a. Valores logarítmicos de UFC/ml de células *S. sanguis* suspendidas después del tratamiento con los 4 colutorios de prueba, mostrados en el gráfico como cuadrados con percentiles de 25%, 50%, y 75%, y con las líneas de medias.

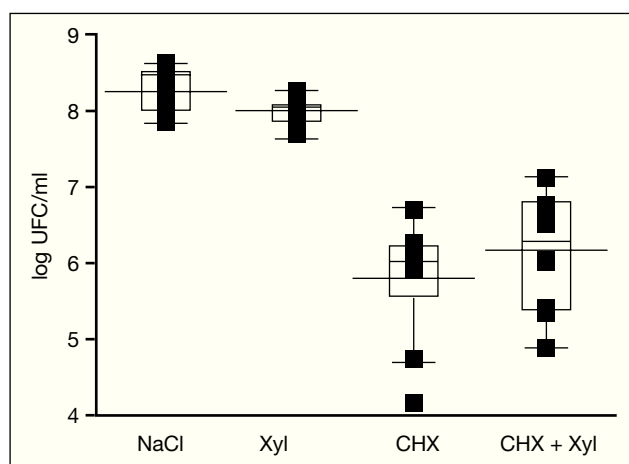


Figura 4b. Valores logarítmicos de UFC/ml de células *S. mutans* suspendidas después del tratamiento con los 4 colutorios de prueba, mostrados en el gráfico como cuadrados con percentiles de 25%, 50%, y 75%, y con las líneas de medias.

La resistencia natural de algunos microorganismos cariogénicos orales, como *S. sanguis*⁸, a la clorhexidina antiséptica estándar puede dificultar la eficacia de la clorhexidina como el agente bactericida antiplaca dental más usado.

En el presente estudio, la combinación de xilitol con clorhexidina mostró un efecto bactericida estadísticamente significativo sobre las células de *S. sanguis* resistentes a la clorhexidina. Esto significa que esta composición convertía a las bacterias metabólicamente

activas en células no vitales. Dentro del escenario experimental del presente estudio, el xilitol administrado como compuesto puro no dificultó el crecimiento de ambos estreptococos, como se demuestra por la formación de unidades formadoras de colonias. Estas observaciones concuerdan con los resultados de Tuompo et al¹⁴, que revelaron que las bacterias incubadas con xilitol mostraban alteraciones ultraestructurales más notables a nivel celular, como células degradadas, autólisis, vacuolas intracelulares, y formaciones lameladas

en la membrana citoplasmática, pero inesperadamente estas células podían cultivarse como los controles no tratados. Estos hallazgos confirman la idea de no sobreestimar el parámetro de unidades formadoras de colonias como único parámetro para evaluar la eficacia de los antimicrobianos sobre los microorganismos orales.

Hay que tener en cuenta que los estadios celulares fisiológicos de las bacterias en la cavidad oral son versátiles. Aparte de células en crecimiento activo sensibles a los agentes bactericidas, pueden estar presentes otros estadios celulares fisiológicos, como las formas celulares latentes anabíóticas, sobre todo en las biopelículas orales que no pueden eliminarse mediante los inhibidores de crecimiento¹⁰. El efecto bactericida superior de la combinación de xilitol/clorhexidina comparado con la clorhexidina pura encontrado en este estudio afecta de forma beneficiosa al estado fisiológico del primer colonizador *S. sanguis* promoviendo la reducción de su actividad metabólica. Por lo tanto, los agentes antisépticos contribuyen a gobernar las biopelículas orales conduciendo a prevención de la caries. La mayor parte de los estudios que han tratado sobre la interacción del xilitol con la clorhexidina han concluido que el xilitol no muestra ninguna mejoría adicional sobre el efecto bactericida de la clorhexidina cuando se combina con ella sino que más bien su comportamiento en la combinación empleada es inerte^{15,16}. Esto ha sido confirmado por las pruebas clínicas y el crecimiento bacteriano de las unidades formadoras de colonias. Sólo se ha informado de una interacción sinérgica en la combinación de clorhexidina y xilitol en presencia de flúor¹⁷. Los datos actualmente disponibles revelaron que múltiples exposiciones de suspensiones de *S. mutans* a clorhexidina seguidas de exposiciones secundarias a xilitol exhibían una inhibición transitoria de crecimiento en 24 h y una disminución significativa de la capacidad de los estreptococos mutans de formar biopelículas¹⁸. Desde el punto de vista clínico, la eficacia del xilitol, polialcohol sustituto del azúcar, como agente preventivo de la caries ha sido demostrada en varios estudios, reduciendo la cantidad de ácido láctico, potenciando la remineralización¹³, aumentando el pH salivar por transaminación, e induciendo colonias aisladas de mutans resistentes al xilitol, menos capaces de producir caries¹⁹⁻²¹.

Conclusión

Los resultados del presente estudio mostraron un efecto antiséptico estadísticamente significativo del xilitol

combinado con la clorhexidina sobre los estreptococos estudiados. Son necesarios más estudios para investigar estas interacciones sobre las biopelículas dentales complejas. Potencialmente, esta nueva propiedad de la combinación estudiada podría contribuir a establecer medidas anticaries sobre formas celulares activas y latentes de los microorganismos orales. Estos resultados y las características terapéuticas favorables documentadas en otros estudios respaldan la idea de incluir al único carbohidrato natural anticariogénico en las nuevas estrategias de prevención de la caries empleando clorhexidina y/o otros compuestos activos en los pacientes de alto riesgo de caries o para la inhibición de la transmisión de *S. mutans* de la madre al niño.

Bibliografía

1. Scheinin A, Makinen KK. Turku sugar studies I–XI. Acta Odontol Scand 1975;33(suppl 70):1-351.
2. Miyasawa-Hori H, Aizawa S, Takahashi N. Difference in the xylitol sensitivity of acid production among Streptococcus mutans strains and the biochemical mechanism. Oral Microbiol Immunol 2006;21: 201-205.
3. Assev S, Rölla G. Further studies on the growth inhibition of Streptococcus mutans OMZ 176 by xylitol. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B] 1986;94:97-102.
4. Forbord B, Osmundsen H. On the mechanism of xylitol-dependent inhibition of glycolysis in Streptococcus sobrinus OMZ 176. Int J Biochem 1992;24:509-514.
5. Pihlanto-Leppälä A, Söderling E, Makinen KK. Expulsion mechanism of xylitol 5-phosphate in Streptococcus mutans. Scand J Dent Res 1990;98:112-119.
6. Waaler SM. Evidence for xylitol 5-p production in human dental plaque. Scand J Dent Res 1992;100:204-206.
7. Makinen KK, Saag M, Isotupa KP, et al. Similarity of the effects of erythritol and xylitol on some risk factors of dental caries. Caries Res 2005;39:207-215.
8. Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. Scand J Dent Res 1977;85:255-265.
9. Featherstone JDB. Delivery challenges for fluoride, chlorhexidine and xylitol. BMC Oral Health 2006;6 (suppl 1):S8.
10. ten Cate J. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. Odontology 2006;94:1-9.
11. Decker E-M, von Ohle C, Weiger R, Wiech I, Brex M. A synergistic chlorhexidine/chitosan combination for improved antiplaque strategies. J Periodont Res 2005;40:373-377.
12. Decker E-M. The ability of direct fluorescence-based, two colour assays to detect different physiological states of oral streptococci. Lett Appl Microbiol 2001;33:188-192.
13. Makinen KK. New biochemical aspects of sweeteners. Int Dent J 1985;35:23-35.
14. Tuompo H, Meurman JH, Lounatmaa K, Linkola J. Effect of xylitol and other carbon sources on the cell wall of Streptococcus mutans. Scand J Dent Res 1983;91:17-25.
15. Nuuja T, Meurman JH, Muromaa H, Kortelainen S, Metteri J. The effect of a combination of chlorhexidine diacetate, sodium fluoride and xylitol on plaque wet weight and periodontal index scores in Military Academy cadets refraining from mechanical tooth cleaning for 7-day experimental periods. J Clin Periodontol 1992;19:73-76.

16. Nuuja T, Meurman JH, Torkko H. Xylitol and the bactericidal effect of chlorhexidine and fluoride on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Acta Odontol Scand* 1993;51:109-114.
17. Meurman JH, Suhonen J. Combination chemotherapy of dental plaque infections. *Proc Finn Dent Soc* 1991;87:549-554.
18. Modesto A, Drake DR. Multiple exposures to chlorhexidine and xylitol: Adhesion and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Curr Microbiol* 2006;52:418-423.
19. Söderling E, Trahan L, Tammiala-Salonen T, Häkkinen L. Effects of xylitol, xylitol-sorbitol, and placebo chewing gums on the plaque of habitual xylitol consumers. *Eur J Oral Sci* 1997;105:170-177.
20. Roberts MC, Riedy CA, Coldwell SE, et al. How xylitol-containing products affect cariogenic bacteria. *J Am Dent Assoc* 2002;133:435-441.
21. Lynch H, Milgrom P. Xylitol and dental caries: An overview for clinicians. *J Calif Dent Assoc* 2003;31:205-209.