

Universidad CEU Cardenal Herrera

Departamento de Odontología



**ESTUDIO DE LA APLICACIÓN DE LA
TERAPIA FOTODINÁMICA SOBRE LAS
PIGMENTACIONES EXTRÍNSECAS
NEGRAS DE ORIGEN BACTERIANO**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

María Amparo Albelda Bernardo

Dirigida por:

Dra. María del Mar Jovani Sancho

Dra. Verónica Veses Jiménez

Dr. Chirag Sheth Shah

VALENCIA

2016

A mis directores de tesis, especialmente a la Dra. Mar Jovani, por el apoyo incondicional, la entrega, la motivación y los conocimientos transmitidos.

A los participantes de este estudio, en particular a Manolo, por su colaboración y su implicación en la investigación.

A Claudia, por la colaboración mutua para llevar adelante este proyecto.

A todo el personal de las clínicas, por su atención, predisposición y amable entrega.

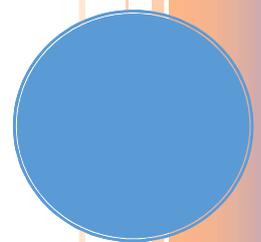
A mi familia, principalmente a mis padres, porque sin su entrega, generosidad y ánimos esto no hubiese sido posible.

A Toni, por su comprensión, paciencia y gran ayuda en los cálculos. Tu dedicación ha sido crucial.

A mi pequeño, porque también esto ha sido posible gracias a ti. Eres mi mayor alegría.

*“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo
y no en el resultado. Un esfuerzo
total es una victoria completa”
(Mahatma Gandhi)*

ÍNDICE

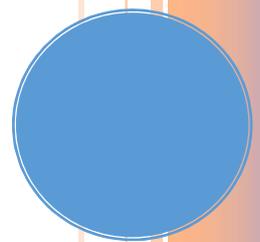


1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
2.1. PLACA DENTARIA	11
2.1.1. PLACA SUPRAGINGIVAL	11
2.1.1.1. PELÍCULA ADQUIRIDA	11
2.1.1.2. COLONIZACIÓN PRIMARIA	11
2.1.1.3. COLONIZACIÓN SECUNDARIA	12
2.1.1.4. PLACA MADURA	12
2.1.1.5. FASE DE MINERALIZACIÓN	14
2.1.2. PLACA SUBGINGIVAL	14
2.2. MICROBIOLOGÍA PLACA SUPRAGINGIVAL Y SUBGINGIVAL	14
2.2.1. PLACA SUPRAGINGIVAL	14
2.2.2. PLACA SUBGINGIVAL	15
2.3. COLONIZACIÓN BACTERIANA DE LA CAVIDAD ORAL DESDE LA INFANCIA A LA EDAD ADULTA	16
2.4. TRANSMISIÓN DE BACTERIAS INTRAORALES INTRAESPECIE	18
2.4.1. TRANSMISIÓN VERTICAL (MATERNO-INFANTIL)	18
2.4.2. TRANSMISIÓN HORIZONTAL	20
2.4.2.1. DIRECTA (VÍA SECRECIONES SALIVALES, MUCOSAS)	20
2.4.2.2. INDIRECTA (MATERIAL INFECTANTE)	21
2.5. TINCIONES DENTARIAS	23
2.5.1. INTRÍNSECAS	23
2.5.1.1. LOCALIZADAS	23
2.5.1.2. GENERALIZADAS	25
2.5.2. EXTRÍNSECAS	26
2.5.2.1. DE ORIGEN BACTERIANO	27
2.5.2.2. DE ORIGEN NO BACTERIANO	30
2.6. MANCHAS DENTARIAS NEGRAS DE ORIGEN BACTERIANO	31
2.6.1. DESCRIPCIÓN CLÍNICA	31
2.6.2. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	34
2.6.3. COMPOSICIÓN DE LA PLACA	37
2.6.3.1. REVISIÓN DE LA LITERATURA	37
2.6.3.2. COMPONENTES DE ORIGEN BACTERIANO	38
2.6.3.3. COMPONENTES DE ORIGEN NO BACTERIANO	47
2.6.4. MECANISMO DE PRODUCCIÓN DEL PIGMENTO	48
2.6.5. PREVALENCIA	55
2.6.6. INFLUENCIA DE OTROS FACTORES	58
2.6.6.1. HIERRO	58
2.6.6.2. RAZA	59
2.6.6.3. COLUTORIOS	59
2.6.6.4. AGUA DE CONSUMO	59
2.6.6.5. NIVEL SOCIOECONÓMICO	60
2.6.6.6. EDAD	60
2.6.6.7. ÍNDICE DE PLACA Y HÁBITOS DE HIGIENE ORAL	61
2.6.6.8. ALIMENTACIÓN EN LACTANTES	61
2.6.6.9. PESO AL NACER	61
2.6.6.10. SEXO	62
2.6.6.11. CONSUMO DE ALIMENTOS Y/O BEBIDAS	62
2.6.6.12. TRANSMISIÓN INTRAFAMILIAR BACTERIANA	62
2.6.6.13. TIPO DE DENTICIÓN	63
2.6.6.14. TIPO DE DIENTE	63
2.6.6.15. INMIGRACIÓN	64
2.6.6.16. OTROS FACTORES ANALIZADOS	64
2.6.7. MANCHAS DENTARIAS NEGRAS Y CARIES DENTAL	65
2.6.8. TRATAMIENTOS APLICADOS EN LA ACTUALIDAD	69
2.6.8.1. REMOCIÓN MECÁNICA	69
2.6.8.2. REMOCIÓN MANUAL CON CURETAS	70
2.7. TRATAMIENTO ALTERNATIVO: TERAPIA FOTODINÁMICA	70

2.7.1. CONCEPTOS BÁSICOS	70
2.7.1.1. ESPECTRO DE LUZ VISIBLE	70
2.7.2. MEDICIÓN DE ENERGÍA DE LAS ONDAS ELECTROMAGNÉTICAS	71
2.7.3. FUNDAMENTOS TERAPIA FOTODINÁMICA	71
2.7.4. EFECTO FOTOTÓXICO EN MICROORGANISMOS	73
2.7.4.1. SIN AGENTES FOTOSENSIBILIZADORES EXTERNOS	73
2.7.4.2. CON AGENTES FOTOSENSIBILIZADORES EXTERNOS	79
2.7.5. EFECTOS SECUNDARIOS TERAPIA FOTODINÁMICA	85
3. JUSTIFICACIÓN	87
4. OBJETIVOS	93
4.1. OBJETIVO PRINCIPAL	95
4.1.1. HIPÓTESIS NULA	95
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	95
5. MUESTRA Y MATERIAL	97
5.1. MUESTRA	99
5.1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	99
5.1.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	99
5.2. MATERIAL	100
5.2.1 MATERIAL PARA LA TOMA DE FOTOGRAFÍAS	100
5.2.2. MATERIAL PARA LA TOMA DE MUESTRAS	100
5.2.3. MATERIAL PARA LA PROFILAXIS DENTAL	101
5.2.4. MATERIAL PARA EL TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS	101
5.2.5. MATERIAL PARA LA TERAPIA FOTODINÁMICA	101
6. PROCEDIMIENTO	103
6.1. OBSERVACIÓN, RECOGIDA DE MUESTRAS Y PROFILAXIS DENTAL	105
6.1.1. PRIMERA CITA (Tiempo 0)	105
6.1.2. REVISIONES (al mes del Tiempo 0 y consecutivamente cada mes)	107
6.1.3. TIEMPO DE REPARACIÓN respecto al Tiempo 0	107
6.1.4. REVISIONES (al mes del Tiempo de Reparación y consecutivamente cada mes)	109
6.1.5. TIEMPO DE RESTAURACIÓN	109
6.2. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS	110
6.3. RECOPIACIÓN DE DATOS CLÍNICOS	110
6.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	112
7. RESULTADOS	113
7.1. MUESTRA SELECCIONADA PARA LA INVESTIGACIÓN	115
7.2. REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO DE MEDICIÓN DE LAS PIGMENTACIONES EXTRÍNSECAS NEGRAS	116
7.3. RESULTADOS RESPECTO A LOS CAMBIOS PRODUCIDOS EN LAS PIGMENTACIONES TRAS LA TERAPIA FOTODINÁMICA	118
7.3.1. CAMBIOS EN EL TIEMPO	118
7.3.2. CAMBIOS EN LA CANTIDAD	119
7.3.3. CAMBIOS EN EL COLOR	128
7.3.4. CAMBIOS EN LA PRESENCIA/AUSENCIA DE BACTERIAS	133
7.4. RESULTADOS RESPECTO A LOS EFECTOS ADVERSOS PROVOCADOS POR LA TERAPIA FOTODINÁMICA	137
8. DISCUSIÓN	139
8.1. DISCUSIÓN RESPECTO AL MATERIAL Y MÉTODO EMPLEADO	142
8.1.1. MUESTRA UTILIZADA EN EL ESTUDIO	142
8.1.2. INSTRUMENTACIÓN EMPLEADA EN LA INVESTIGACIÓN	143
8.1.2.1 PARA LA TOMA DE MUESTRAS	143
8.1.2.2. PARA LA TERAPIA FOTODINÁMICA	144
8.1.2.3. SISTEMA PARA EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LA PIGMENTACIÓN EXTRÍNSECA NEGRA	146
8.1.3. METODOLOGÍA EMPLEADA EN LA TERAPIA FOTODINÁMICA	148
8.1.3.1. PROTOCOLO DE USO DE LA LÁMPARA	150
8.2. DISCUSIÓN RESPECTO A LOS CAMBIOS PRODUCIDOS EN LAS PIGMENTACIONES TRAS LA TERAPIA FOTODINÁMICA	152
8.2.1. CAMBIOS EN EL TIEMPO, CANTIDAD Y COLOR	152

8.2.2. CAMBIOS PRODUCIDOS EN LA PRESENCIA/AUSENCIA DE BACTERIAS ANTES Y TRAS LA TERAPIA FOTODINÁMICA	159
9. CONCLUSIONES	165
10. BIBLIOGRAFÍA	169
11. ANEXOS	195
ANEXO A. CLASIFICACIÓN DE LA PIGMENTACIÓN EXTRÍNSECA NEGRA	197
ANEXO B. CÁLCULO DE LA POTENCIA DE LA LÁMPARA	199

1. INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

La importancia del físico y la apariencia en la cultura de los países occidentales ha dado lugar a una mayor demanda de estética dental. La búsqueda por conseguir una mejor sonrisa, respetando la integridad de los tejidos dentales y de la mucosa oral, es objeto de continuas experimentaciones de nuevos materiales y métodos¹.

Gracias a la odontología estética, muchos problemas de las personas que acuden a los gabinetes dentales preocupados por el aspecto de su sonrisa se ven solucionados, ya sea mediante el uso de resinas compuestas, blanqueamientos dentales con peróxido de hidrógeno, peróxido de carbamida, etc. o con el empleo de carillas o coronas, entre otros.

Dentro de este ámbito, una de las dificultades que se le presentan al odontólogo en la práctica diaria es el tratamiento de las alteraciones cromáticas de los dientes, tanto de origen extrínseco como de origen intrínseco. Las primeras, ocasionadas por la incorporación de materiales cromógenos al esmalte y a la dentina, bien antes o después de la erupción dentaria, obligan a optar por tratamientos más complejos para su eliminación y normalmente son más agresivos para la estructura dentaria. Por el contrario, las segundas, causadas por la deposición de pigmentos o detritus sobre la superficie dental, suelen ser suprimidas con mayor facilidad originando pequeños o ningún trastorno en el esmalte.

Sin embargo, entre estas últimas, las manchas dentarias extrínsecas negras constituyen una clara excepción a lo citado. Estos depósitos, que se manifiestan en forma de puntos o líneas de color negro situados de forma paralela al margen gingival de los dientes, usualmente en el tercio cervical, están muy adheridos al esmalte y son difíciles de remover².

Pese a que estas manchas no tienen una relevancia significativa para el profesional debido a la baja prevalencia que poseen (aunque en algunas regiones del mundo representan una consulta habitual en el gabinete dental), resultan molestas para el paciente portador, ya que confieren una imagen antiestética a nivel oral.

El tratamiento habitual practicado en estos casos es someter al paciente a repetidas y frecuentes profilaxis dentales, causando perjuicio a la superficie adamantina, aparte del trastorno psicológico asociado por las reiteradas visitas al gabinete dental sin que se pueda conseguir la desaparición definitiva de las manchas, lo cual repercute en el ánimo del mismo.

Aunque la etiología de este proceso no se conoce con exactitud, sí se ha observado que este pigmento tiene características similares a la protohemina y protoporfirina³. La protohemina es un producto de descomposición de la hemina, derivado de la hemoglobina, mientras que la protoporfirina forma la base del grupo hemo, constituyendo con una proteína la hemoglobina. En cultivos de *Prevotella melaninogenica* y *Prevotella intermedia* en laboratorio con medio agar/sangre se halla de forma predominante protoporfirina⁴.

La hemina, en concreto, se consideraría como un factor relevante para el crecimiento de estas bacterias que viven en el surco gingival, entre otras. Todo ello es posible gracias a que *P. intermedia* es capaz de unirse a la hemoglobina humana porque posee un receptor con gran afinidad⁵.

Considerando otras moléculas con capacidad de unión al hierro, como la transferrina, encontramos que *Prevotella nigrescens* y *P. intermedia* se desarrollan si hay holotransferrina, pero no apotransferrina, lo cual indicaría que ambas especies pueden obtener hierro de la transferrina del plasma. La holotransferrina y la apotransferrina son derivados de la transferrina, proteína transportadora específica de hierro en el plasma. En *P. nigrescens* se desarrolla este proceso gracias a la proteína 37-kDa que se encuentra en su superficie⁶. Este proceso acontece cuando los niveles de pH son bajos (4,5 a 6), siendo menor en pH neutro y prácticamente insignificante en pH alcalino. Lo mismo ocurre para *Porphyromonas gingivalis*⁷.

En afecciones como la gingivitis y la periodontitis, muchas bacterias anaerobias y proteolíticas se benefician de la liberación de hemoglobina y transferrina empleándolas como nutrientes esenciales. Estas moléculas son expulsadas en mayor cantidad debido al aumento del fluido crevicular como reacción a la acumulación de placa bacteriana⁸ (fig.1).

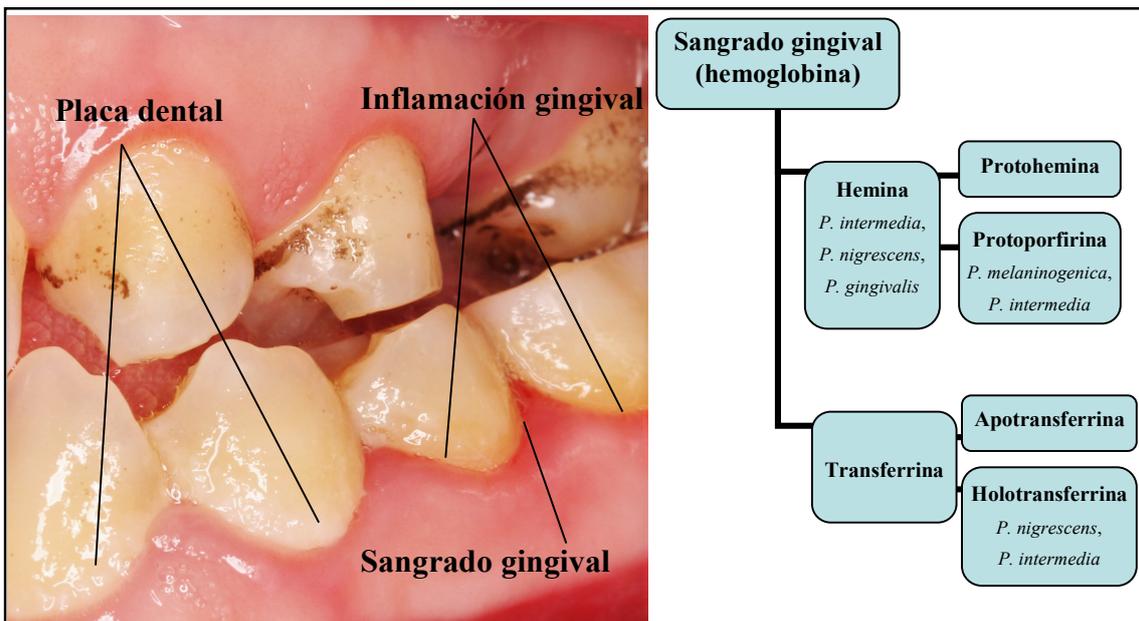


Fig. 1. Mecanismo de liberación de hemina y transferrina y su aprovechamiento por parte de las distintas bacterias (fuente: autor).

Por otra parte, la tendencia más elevada a la calcificación de esta placa sería debida a la mayor proporción de calcio y fósforo en saliva⁹. La fijación inicial de estas bacterias se realizaría a través de puentes de hidrógeno a las proteínas de la placa dental y al diente mediante puentes de calcio, quedando por tanto también incrustados los pigmentos en la misma.

Conociendo, asimismo, que la cavidad oral es un hábitat para numerosos microorganismos que están a su vez implicados en distintas patologías, se puede intuir la doble participación que tienen estas bacterias pigmentadoras de negro en una de las más importantes enfermedades a nivel oral, la enfermedad periodontal.

Al tratarse de un problema notable en la población humana, numerosos estudios han sido llevados a cabo con el objetivo de inhibir o eliminar las bacterias responsables de la pérdida de hueso alveolar, entre ellas las bacterias citadas.

No hay que olvidar el papel crucial que juega en este proceso la transmisión intrafamiliar bacteriana. Es más probable que los niños cuyos padres muestran claramente enfermedad periodontal, tengan mayor posibilidad de presentar bacterias periodontopatógenas en la cavidad oral, tales como *P. gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia*¹⁰.

Como el estado periodontal clínico en embarazadas es un claro indicador del patrón de colonización bacteriana observado en recién nacidos¹¹ y sabiendo que las bacterias pigmentadoras de negro están implicadas en la aparición de las manchas extrínsecas negras, merece especial atención el papel que juega la transmisión de bacterias entre miembros de una misma familia.

El objetivo de la terapia periodontal convencional, también conocido como raspado y alisado radicular, está encaminado a eliminar los agentes etiológicos que causan la inflamación. A lo largo de los últimos años se está experimentando con otra terapia, llamada terapia fotodinámica antimicrobiana no invasiva, que consiste en la inactivación de las células bacterianas, microorganismos o moléculas mediante el uso de una luz externa, logrando también resultados positivos^{12,13}.

El mecanismo de acción de la terapia fotodinámica consiste en la absorción por parte de los microorganismos de un fotosensibilizador (sustancia fotoactivable) que, después de la exposición a la luz a una adecuada longitud de onda, absorbe fotones de energía y pasa al siguiente estado, el estado excitado del oxígeno singlete, y origina a su vez radicales libres, los cuales son citotóxicos. La célula, asimismo, posee una función fotoreguladora determinada por fotorreceptores que absorben fotones de determinada longitud de onda, lo que en conjunto provoca la transformación de la actividad metabólica y funcional de la misma¹⁴ (fig. 2).

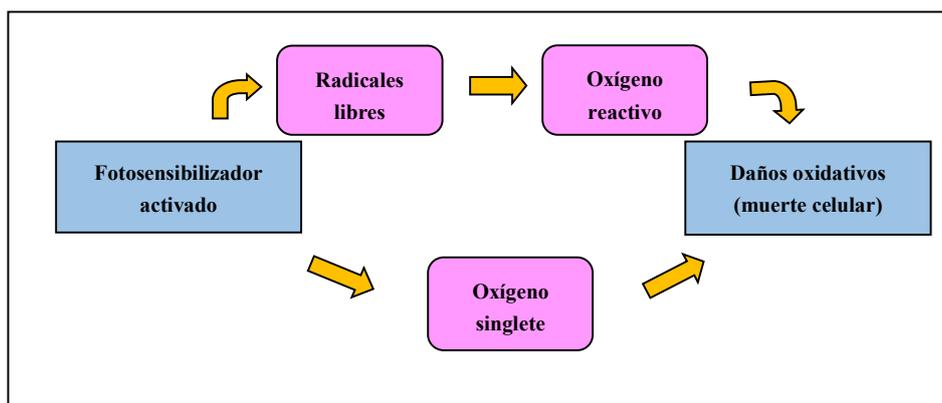


Fig. 2. Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica¹².

Esta terapia, aunque es empleada en el tratamiento periodontal con diferentes colorantes que actúan como agentes fotosensibilizadores, no necesita de estos últimos para inhibir el crecimiento de *P. gingivalis*, ya que solo con luz azul cuya longitud de onda esté comprendida entre los 408-495 nm sin la ayuda de fotosensibilizadores externos, es evidente su actividad bactericida. Es probable, en consecuencia, que estos microorganismos posean elevados niveles de porfirinas que podrían actuar como agentes fotosensibilizadores internos¹⁵.

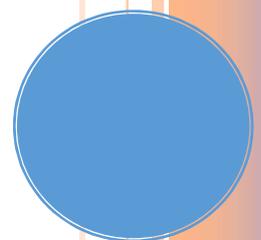
En cuanto a los posibles efectos adversos de la terapia fotodinámica, se ha visto que, aplicando un dispositivo a nivel intraoral de tres luces de emisión de diodos (LED) en las caras bucales de premolares y molares maxilares y mandibulares durante cuatro minutos diariamente por un total de cuatro días (energía liberada por la luz: 8,4 J/cm²), no hay dolor, malestar o irritación intraoral asociados. Como probable beneficio se ha observado que el eritema gingival disminuye de forma importante, por lo que la luz podría también mostrar actividad antiinflamatoria, a la par que antibacteriana¹⁶, ya que es obvia la reducción en los niveles de bacterias pigmentadoras de negro, especialmente *P. gingivalis* y *P. intermedia*.

A modo de resumen, las ventajas que la terapia fotodinámica puede aportar a nivel clínico, microbiológico e inmunológico con impacto mínimo en la microbiota, son numerosas. Entre ellas, se podrían citar:

- Proceso rápido e indoloro.
- Ausencia de efecto fototóxico para las células humanas.
- Destrucción de las bacterias presentes en las células epiteliales gingivales por la acción de la luz en los tejidos y en la placa.
- Selectividad por los microorganismos patógenos¹⁶.

Dada la posible intervención de estas bacterias periodontopatógenas en la formación de las manchas extrínsecas negras, la terapia fotodinámica antimicrobiana no invasiva supondría un método inédito para su tratamiento. Aparte de suponer una técnica que no implicaría costes inasumibles por los pacientes, al tratarse de fuentes de luz de longitudes de onda que habitualmente se emplean en los gabinetes dentales para el fotocurado de las resinas compuestas, no acarrearía efectos secundarios a nivel de los tejidos blandos, hecho constatable por la aplicación de la luz en la terapia conservadora.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. PLACA DENTARIA

La placa dentaria está comprendida por diferentes capas que contienen proteínas, hidratos de carbono, fosfatos y microorganismos. Se forma especialmente en aquellas zonas donde la limpieza dentaria es insuficiente. La placa dentaria puede provocar caries, gingivitis y periodontitis.

2.1.1. PLACA SUPRAGINGIVAL

La placa supragingival es una sustancia de color blanco que se deposita sobre la superficie de los dientes. Está constituida principalmente por proteínas salivares, alimentos (azúcares y ácidos), por bacterias y por toxinas secretadas por las mismas.

2.1.1.1. *PELÍCULA ADQUIRIDA*

La película adquirida es una capa amorfa acelular que se forma de manera espontánea sobre la superficie limpia adamantina pocos minutos después del cepillado dental. Esta película está formada por la adsorción selectiva de proteínas y glucoproteínas provenientes de la saliva y el líquido crevicular, no tiene estructura y su grosor varía (80 nm hasta 2 μ m) en función de la localización de la misma y del tiempo de formación. En su formación están involucradas fuerzas de atracción de distinta naturaleza como enlaces iónicos, de hidrógeno, o fuerzas de Van der Waals que van a contribuir en la adsorción de dichas glucoproteínas. Entre las funciones de la película adquirida se encuentran la función protectora de los tejidos dentarios, la reducción de la solubilidad de la superficie del esmalte y la protección del mismo frente a la acción de los ácidos¹⁷.

2.1.1.2. *COLONIZACIÓN PRIMARIA*

Tres horas después del cepillado dental comienza también la colonización bacteriana, posiblemente con el *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis* y *Streptococcus oralis*. Inmediatamente después se une *Actinomyces naeslundii* y *Neisseria* spp. Estas primeras bacterias están unidas a la película adquirida por enlaces frágiles y alterables.

Pese a ello, una parte de ellas permanece firmemente adherida y da lugar a una sucesión autogénica, donde las propias bacterias generan o inducen cambios físico-químicos locales que, a su vez, cambian la composición microbiana de la película. En este punto, la biopelícula, mayormente aerobia, es colonizada también por bacterias anaerobias facultativas, como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus milleri* y *Streptococcus gordonii*, entre otros. También es posible hallar cocos anaerobios gram-negativos como *Veillonella* spp. y, aunque en pocas cantidades pues son anaerobios estrictos, *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp. y *Fusobacterium* spp.¹⁷.

2.1.1.3. COLONIZACIÓN SECUNDARIA

La colonización secundaria tiene lugar 3 a 5 días más tarde del comienzo de la formación de la película adquirida. Son pocas las bacterias nuevas que se adhieren a la biopelícula, aunque el fenómeno de agregación y coagregación bacteriana continúa. A los siete días aproximadamente, los *Streptococos* constituyen la especie más predominante, distribuyéndose en cualquier lugar y, dos semanas después, comienzan a abundar los bacilos gram-negativos¹⁷.

2.1.1.4. PLACA MADURA

Con el transcurso del tiempo, la placa aumenta su grosor, con lo que las zonas más profundas manifiestan la carencia de oxígeno, y las bacterias aerobias, por consiguiente, desaparecen de esta zona siendo relevadas por otras con un potencial *redox* más bajo. Suele llegarse a conformarse esta placa madura a las 2 ó 3 semanas. Se trata de una placa de estructura relativamente estable compuesta entre un 60-70% de su volumen por microorganismos (fig. 3), junto con una matriz orgánica, la cual está formada principalmente por polisacáridos extracelulares provenientes de los microorganismos, así como también por glicoproteínas, restos alimenticios y restos celulares. Los componentes inorgánicos que se hallan son calcio y fosfato principalmente y, en menores cantidades, magnesio, potasio, sodio e iones de flúor¹⁸.

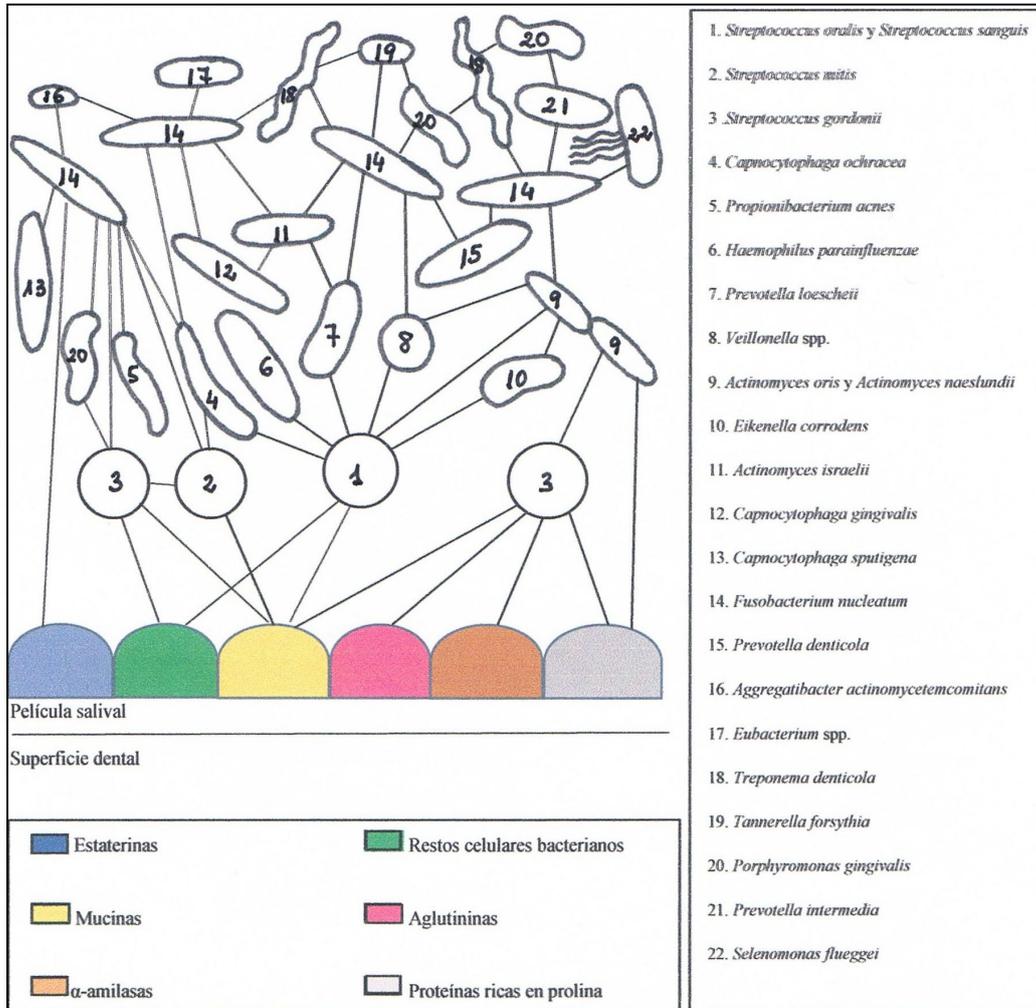


Fig. 3. Colonización oral bacteriana¹⁹.

2.1.1.5. FASE DE MINERALIZACIÓN

Transcurrido cierto tiempo, la placa madura se mineraliza, dando lugar al cálculo, tártaro o sarro. Su período de formación es muy variable, desde días a semanas. La rapidez de crecimiento, el grado de dureza, la adherencia y la imagen clínica son también heterogéneos. La causa de esta adhesión es la calcificación de la película adquirida al esmalte debajo de la placa bacteriana. La cantidad de material inorgánico aumenta hasta el 75-80%, mientras que el orgánico se encuentra alrededor del 20-25%¹⁸.

2.1.2. PLACA SUBGINGIVAL

Si esta placa supragingival ya mineralizada no es debidamente eliminada, las encías se ven afectadas por gingivitis que, con el transcurso del tiempo y sin hábitos higiénicos adecuados, progresa a una periodontitis. En esta fase la placa no solo se acumula por encima de la encía, sino que empieza a localizarse en el surco o hendidura gingival. La composición microbiana de la flora subgingival difiere de la supragingival debido principalmente a la poca disponibilidad de oxígeno en esta localización, que hace más favorable el crecimiento de bacterias anaerobias estrictas. Está comprendida en un 25% por *Streptococos*, 25% *Actinomices*, 25% bacilos gram-negativos (*Fusobacterium*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*) y en un 25% de otros tipos bacterianos¹⁷.

2.2. MICROBIOLOGÍA PLACA SUPRAGINGIVAL Y SUBGINGIVAL

2.2.1. PLACA SUPRAGINGIVAL

Utilizando la técnica de fluorescencia *in situ* (FISH) *in vivo*, pueden ser observadas en general dos capas distintas. La capa basal, que se encuentra adherida a la superficie dental, muestra cuatro tipos diferentes de *biofilm*. El primero, un *biofilm* compuesto solo de *Actinomyces* perpendicularmente orientados al diente. El segundo tipo es una mezcla de *Actinomyces* spp. y cadenas de cocos, que no se identifican como *Streptococos*, también perpendicularmente orientados a la superficie dental.

El tercer tipo estaría formado por bacterias filamentosas, *Streptococos* y levaduras, donde los segundos formarían una colonia alrededor de las últimas. Por último, el cuarto tipo sería un *biofilm* constituido predominantemente por *Streptococos* creciendo en proximidad a *Lactobacillus* spp., los cuales estarían dispuestos perpendicularmente a la superficie dental²⁰.

La segunda capa podría hallarse en la parte más superior de cualquier tipo de *biofilm* de la capa basal. Los estreptococos se pueden observar de distintas formas, bien como células heterogéneas a través de esta capa sin ninguna organización aparente, o bien alineados formando un manto delgado encima de la capa del segundo *biofilm*. Además, colonizan las fisuras en el *biofilm*, es decir, habría una mezcla variada de células bacterianas pertenecientes al género *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*. Finalmente, *Lactobacillus* spp., se encuentra ubicado lejos de la superficie dental y está rodeado de células de distintas morfologías²⁰.

2.2.2. PLACA SUBGINGIVAL

El género *Actinomyces* spp., se halla en la primera capa del *biofilm*. A continuación, se observa la capa intermedia, compuesta por muchas células con forma de huso, como *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia* (los cuales interactúan con colonizadores primarios y tardíos) y otras especies del género *Tannerella* spp. En la capa superior y parte de la capa intermedia se encuentran muchas células pertenecientes al grupo *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*. Muchas de las bacterias con forma de filamento son del género *Tannerella* spp., mientras que las que tienen forma de bastón son predominantemente *Prevotella* spp.

Además de las citadas bacterias, hay células alargadas (como cigarrillos) dispuestas en empalizada, los leucocitos polimorfonucleares, en íntimo contacto con células eucarióticas. En el exterior del *biofilm*, se aprecia una cuarta capa sin una clara organización, donde la especie que más destaca son las *Spirochaetes*²⁰.

2.3. COLONIZACIÓN BACTERIANA DE LA CAVIDAD ORAL DESDE LA INFANCIA A LA EDAD ADULTA

El proceso de colonización bacteriana es un hecho indiscutible, como lo avalan la mayoría de los artículos publicados sobre el tema. A los pocos días de vida, el recién nacido empieza a adquirir una microbiota oral que va a aumentar de forma significativa en poco tiempo. Además, los microorganismos constituyentes están directamente relacionados con las bacterias presentes en la cavidad oral de los seres humanos de su entorno.

No necesariamente la colonización bacteriana tiene lugar en aquellos hábitats específicos de cada especie. La lengua, principalmente, actúa como un reservorio para la mayoría de las bacterias, por lo que se recomienda una higiene minuciosa de la misma. Otros emplazamientos habituales son la mucosa, la placa supragingival, el fluido crevicular gingival y las áreas interproximales por debajo del punto de contacto.

Las especies halladas más frecuentemente son *S. mutans*, *S. oralis*, *S. mitis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*, entre otros, aunque a diferentes edades según los distintos autores (tabla 1). Es evidente, asimismo, que las bacterias que forman parte del complejo rojo aumentan en número según el niño se va haciendo mayor. El complejo rojo está constituido por tres anaerobios invasivos en contacto con la mucosa y relacionados con la respuesta inflamatoria: *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *P. gingivalis*. Se incorporan de forma tardía en el desarrollo de la biopelícula y se considera que son agentes etiológicos principales en el desarrollo de la periodontitis.

Sin embargo, la presencia de estos microorganismos no es indicativo de futura enfermedad periodontal, ni es dependiente del índice de placa, índice de sangrado, nivel de higiene oral o la presencia de lesiones cariosas.

Autores	Tamaño muestral	Edad	Bacterias presentes	Localización	Relación con caries o sangrado gingival
Zambon y cols. ²¹	5 niños	3-6 años	No hay <i>Bacteroides melaninogenicus</i> spp. o <i>Bacteroides gingivalis</i>	—	—
Alaluusua y Asikainen ²²	—	4-7 años	<i>A. actinomycetemcomitans</i> (55%)	Placa supragingival (segundos molares, primeros molares, incisivos deciduos)	—
Zimmer y cols. ²³	36 niños	6-11 y 14-16 años	<i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i>	Dorso de la lengua, placa bacteriana (interproximal 8.5. y 4.6.)	—
McLellan y cols. ²⁴	198 niños	0-18 años	<i>P. gingivalis</i>	Mucosa, surco gingival	—
Morinushi y cols. ²⁵	40 niños	2-18 años	<i>P. gingivalis</i> (60%), <i>A. actinomycetemcomitans</i> (75%)	Placa subgingival	—
Tanner y cols. ²⁶	171 niños	6-36 meses	<i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i> (30%), <i>L. actobacillus acidophilus</i> , <i>P. intermedia</i> (29%), <i>P. gingivalis</i> (23%), <i>B. forsythus</i> (11%), <i>T. denticola</i> (36%)	Dorso de la lengua, región cervical supragingival 5.1., lesiones de caries cavitadas	<i>S. mutans</i> tiene asociación significativa en individuos con más de 2 caries
Makhoul y cols. ²⁷	—	30-34 semanas de gestación	Bacterias gram-negativas no <i>Escherichia coli</i> (bebés sometidos a antibioterapia)	—	—
Tanaka y cols. ²⁸	60 niños	3-16 años	<i>P. gingivalis</i> (60%), <i>P. intermedia</i> (17%), <i>A. actinomycetemcomitans</i> (23%)	Placa supragingival	No hay relación con índice de placa y presencia de lesiones cariosas
Gafan y cols. ²⁹	118 niños	5-9 años	<i>P. gingivalis</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>T. forsythensis</i>	Placa supragingival (primer molar permanente)	—
Cortelli y cols. ³⁰	—	2,5-18 años	<i>C. rectus</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>T. forsythia</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i>	Surco gingival, lengua, mucosa	—
Papaionannou y cols. ³¹	—	3-12 años	<i>P. melaninogenica</i> , <i>T. denticola</i> , <i>T. forsythia</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i>	Dorso de la lengua, saliva, placa supragingival, placa subgingival, fluido crevicular	—
Cavalca y cols. ³²	196 niños	6-12 años	<i>S. mutans</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>T. forsythia</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i>	Placa supragingival (primer molar superior e incisivo superior derecho), dorso de la lengua	No hay relación con caries o sangrado gingival y población bacteriana
Aquino y cols. ¹¹	76 niños	Recién nacidos	<i>C. rectus</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>T. forsythia</i>	Dorso de la lengua	—

Tabla 1. Bacterias presentes en la cavidad oral según la edad.

2.4. TRANSMISIÓN DE BACTERIAS ORALES INTRAESPECIE

2.4.1. TRANSMISIÓN VERTICAL (MATERNO-INFANTIL)

La gran similitud existente en la composición de la microbiota oral entre miembros de una misma familia evidencia la transmisión bacteriana de padres a hijos, lo cual es importante para determinar los factores de riesgo en la adquisición de enfermedades y para el desarrollo de estrategias preventivas de las mismas^{26,33,34}. Este proceso tiene lugar más frecuentemente en la raza negra que en la caucásica³⁵.

Desde el nacimiento, el indicador más fiable de la colonización bacteriana es el estado clínico periodontal de las madre¹¹. En 43 recién nacidos y sus respectivas progenitoras con buena salud gingival, *Campylobacter rectus* es el microorganismo más usual, pero *P. intermedia* y *P. gingivalis* no se observan, mientras que si la madre está afectada por periodontitis (n=33), *P. gingivalis* es la que más niveles posee, seguida de *P. intermedia*, *T. forsythia*, *C. rectus* y *A. actinomycetemcomitans*. Comparando los 2 grupos mencionados, la prevalencia de bacterias periodontopatógenas en recién nacidos es mucho mayor en el segundo grupo. Cabrera³⁶ afirma que la presencia de *Prevotella intermedia* en el surco gingival de las gestantes es mayor cuanto más nivel de placa gingival haya (índice de higiene oral de Greene y Vermillion). Es irrelevante el trimestre de gestación para que aumente el número de esta bacteria en la misma localización. La autora explica que puede deberse a la mayor anaerobiosis provocada por la placa dental en el surco gingival y a los componentes de la misma, que servirían de sustrato a *Prevotella intermedia*.

Es más probable que los niños cuyos padres muestran claramente enfermedad periodontal, tengan mayor posibilidad de presentar bacterias periodontopatógenas en la cavidad oral, tales como *P. gingivalis*, *T. denticola* y *B. forsythus*^{10,37}. La vía de inoculación es incierta, no obstante se presume que el contagio se produce por la saliva.

Si la condición periodontal de los ascendentes es más grave, los niveles de transmisión de bacterias son mayores. En 7 familias cuyos padres tienen periodontitis, *P. gingivalis* está presente en el 71,4% de los casos (considerando padres y madres), y en el 35,7% de los descendientes. Así como *P. nigrescens*, *Capnocytophaga gingivalis* y *Capnocytophaga ochracea* se observan en ambos padres e hijos, los niveles de *Tannerella forsythensis* y *Capnocytophaga sputigena* son mucho mayores si se compara con un estado gingival óptimo. El porcentaje de niños positivos, cuyos padres también lo son, para *P. intermedia* es del 16,7%, *T. forsythensis* 59,5%, *T. denticola* 29,2%, *A. actinomycetemcomitans* 42,9% y *P. gingivalis* 21,4%^{38,39,40}.

Otros autores^{41,42} discrepan en la presencia de bacterias periodontopatógenas y su transmisión, hecho que intentan explicar por las distintas condiciones clínicas entre madres e hijos. Para ellos, no resulta relevante el estado periodontal previo de los progenitores después de investigar a 20 mujeres con periodontitis crónica severa y un hijo de cada una de ellas (media de edad 11,8±3,4 meses de edad), ya que no encuentran una asociación significativa en la pérdida de inserción severa entre madres e hijos. En concreto, *Campylobacter* spp., a pesar de estar presente en 8 madres, apenas se halla en 3 niños, solamente habiendo transmisión directa en 2 casos. *Eikenella corrodens* no está en ninguno de los pacientes. *Peptostreptococcus micros* es compartido por dos pares de madres a hijos. *Fusobacterium* spp., se ubica en 14 madres y 10 hijos, aunque coincide en 8 pares de madres a hijos. *P. gingivalis*, por su parte, no se advierte en ningún niño y solo en una madre. Igualmente *Capnocytophaga* spp., no es compartido por madres e hijos, observándose en 2 madres y en 1 hijo. Por último, *Prevotella* spp., sí que se exhibe en todos los individuos, excepto en un hijo.

También se puede atribuir la inexistencia de la transmisión a diferentes factores, como la población estudiada, métodos de búsqueda, etc.⁴³.

2.4.2. TRANSMISIÓN HORIZONTAL

2.4.2.1. *DIRECTA (VÍA SECRECIONES SALIVALES, MUCOSAS)*

- ENTRE ESPOSOS

Las condiciones periodontales de un sujeto que presenta enfermedad periodontal con probabilidad afectarán a su pareja porque, como el vehículo de transmisión de bacterias es la saliva, la composición del *biofilm* oral de ambos va a ser parecida. Estos microorganismos, localizados en las bolsas periodontales, serán transportados por medio de la saliva a través de comportamientos tan comunes como un simple beso, con lo que el cónyuge tiene mayor riesgo de adquirir periodontitis, sobre todo si es susceptible de padecerla^{38,40}. El factor tiempo no es relevante en este proceso de adquisición⁴⁴.

Evaluando el perfil microbiológico por la técnica de PCR de 9 parejas casadas al menos por un período de tiempo de 10 años, algunos autores⁴⁵ afirman que éste empareja a la perfección en cuanto a las especies y proporciones de las mismas como si se tratase del mismo ecosistema oral. Donde se aprecian algunas diferencias es en aquellos individuos con una carga total bacteriana con baja susceptibilidad para la enfermedad periodontal, puesto que necesitan de un mayor número de patógenos para llegar al grado de empeoramiento del estado periodontal del cónyuge. En otras parejas, no obstante, el perfil microbiológico de un miembro del matrimonio tiene mayor prevalencia de bacterias del complejo rojo, determinantes de enfermedad periodontal activa (*P. gingivalis*, *T. denticola* y *T. forsythia*), mientras que el otro miembro lo tiene del complejo naranja (*P. intermedia*, *P. nigrescens*, *C. rectus*, *F. nucleatum*), sugiriendo una evolución diferente de la enfermedad periodontal.

Si las bacterias asociadas a la periodontitis que forman parte del *biofilm* subgingival están en íntima relación con la superficie epitelial de la pared blanda de la bolsa periodontal, serán predominantemente las constituyentes del complejo rojo.

Estas bacterias se incorporan de forma tardía en el desarrollo de la biopelícula y, para dar lugar a su aparición, necesitan de la participación de otro microorganismo, el *Fusobacterium nucleatum*, que pertenece al complejo naranja. Éste va a actuar como un “puente” entre los colonizadores primarios y los tardíos en el desarrollo de la biopelícula.

• ENTRE HERMANOS

Al igual que es plausible la transmisión de microorganismos de padres a hijos, es muy viable la existencia de una infección cruzada entre hermanos que ratifique este hecho. Así, se observan similitudes en los niveles de *P. gingivalis*, *T. denticola*, *P. intermedia* y *P. nigrescens*. Igualmente, según Ardila y Guzmán⁴⁰, se hallan niveles importantes de *F. nucleatum* y de *P. gingivalis* en 5 hermanos.

Sin embargo, no es posible saber si la concordancia entre hermanos es debida a la transmisión propia entre niños o a la exposición común a ambos padres⁴⁴. Sería importante, en consecuencia, analizar el papel de la susceptibilidad a la infección y los factores genéticos presentes en cada caso. El componente genético respecto a los niveles de placa supragingival y el grado de inserción periodontal es tangible entre adultos gemelos⁴⁶.

2.4.2.2. INDIRECTA (MATERIAL INFECTANTE)

Es posible la transmisión de gérmenes por medio del uso de cepillos dentales, con juguetes o por contacto directo con saliva o vía aérea⁴⁷.

Los cepillos dentales son una vía de transferencia de microorganismos importante. De 102 sujetos pertenecientes a distintas familias y los cuales usan cepillos dentales individuales por un espacio de tiempo de 1 mes, se extrae que éstos resultan contaminados, aunque en bajas proporciones, por *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *P. intermedia/nigrescens*. Los microorganismos hallados de forma más habitual en los cepillos de los padres son *Fusobacterium* spp., *P. intermedia/nigrescens*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*, en este orden⁴⁸.

En consecuencia, recomiendan reemplazar el cepillo dental al menos mensualmente para minimizar la contaminación bacteriana y, por tanto, reducir el riesgo de transmisión de los microorganismos. Además, los cepillos deberían ser guardados adecuadamente para evitar el contacto entre las cerdas. En el caso de que estos instrumentos se encuentren expuestos al medio ambiente del cuarto de baño, se contaminan también por *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae* spp., quizá por las condiciones de almacenamiento, humedad y distancia al retrete.

Los colegios también representan lugares donde es más probable que se produzca contaminación microbiana de los cepillos dentales por su uso entre los niños. Si el cepillado no es supervisado, puede que los escolares usen el mismo cepillo dental, lo intercambien o que éstos entren en contacto. Entre niños de 4 a 6 años con un cepillo dental diferente y almacenado en distintas tazas separados unos de otros, se demuestra la transmisión bacteriana al no estar sometidos a un control por parte de los educadores durante el cepillado. Los cepillos están altamente contaminados por microorganismos más de 2 horas después de su uso, cuando son analizados, por lo que se recomienda su almacenamiento en una habitación ventilada con el propósito de disminuir el número de bacterias. El grupo de microorganismos hallado en mayor proporción son los estreptococos, predominantemente *S. salivarius*, *S. sanguis* y *S. mitis*. Después de éstos, los anaerobios y los microaerófilos constituyen un tercio de la flora. También se observan hongos en el 50% de las muestras, siendo *Candida* el género más abundante⁴⁹.

Otra vía de transmisión podrían ser los utensilios de comida. Debido a que esta colonización permanece de forma estable en el tiempo, indicaría que no es necesario un largo período de inoculación. De un total de 564 individuos de 104 familias, la prevalencia global de *P. gingivalis* es del 37,1% (tasas del 50% en abuelos hasta 27,1% en niños). Estos últimos, contrastado con los abuelos, están menos colonizados por estas bacterias. Este hecho, sin embargo, no es significativo entre los niños y sus progenitores o entre los progenitores y sus respectivos padres⁴⁴.

El riesgo de colonización es 4,65 veces mayor en el caso que la madre sea portadora de esta bacteria y, si es el padre, la cifra es del 2,98. Por otro lado, la probabilidad de adquisición de la bacteria es 2,4 veces mayor para el primer y segundo hijo, y más aún si ambos padres son portadores. Parece verosímil pensar que aquellos abuelos que están muy en contacto con sus nietos constituyen una fuente potencial de transmisión.

2.5. TINCIONES DENTARIAS

Otro punto importante a valorar es la capacidad de las bacterias de provocar tinciones sobre la superficie dental. Debido a que hay otras sustancias que también pueden desarrollar este proceso, tanto a nivel externo como interno de la corona clínica del diente, es importante diferenciar las tinciones dentarias de origen bacteriano de aquellas que son de origen farmacológico, por metales, traumatismos, etc.

2.5.1. INTRÍNSECAS

Son todas aquellas tinciones que son ocasionadas por la incorporación de materiales cromógenos dentro del esmalte y la dentina, tanto antes como posteriormente a la erupción dentaria. A su vez, se pueden clasificar en localizadas, si solo afectan a un diente, o generalizadas, cuando la discoloración se observa en ambas arcadas dentarias.

2.5.1.1. LOCALIZADAS

- **DE ORIGEN TRAUMÁTICO**

Después de un traumatismo, el diente puede mostrar una coloración rosada que, después, puede derivar en una coloración grisácea, debido a la hemorragia producida en la cámara pulpar como consecuencia de la ruptura de los vasos sanguíneos. La sangre es conducida después a través de los túbulos dentinarios y se produce la degradación de la hemoglobina. Si lo que se desencadena es una resorción interna, el esmalte expone una coloración rosada⁵⁰.

• DE ORIGEN IATROGÉNICO

Como consecuencia de un tratamiento de conductos defectuoso, pueden quedar remanentes de gutapercha en la cámara pulpar o puede no haberse procedido correctamente a la eliminación del material sanguíneo de la misma, dando lugar a una coloración que puede variar entre grisáceo a amarillento/anaranjado. Por otra parte, algunos materiales de restauración empleados en la práctica clínica, como las amalgamas o composites (fig. 4), originan un cambio en la tonalidad de la pieza dentaria afectada, grisáceo o amarillento, respectivamente.



Fig. 4. Tinción iatrogénica por amalgama (fuente: autor).

Además, algunas pastas intraconducto empleadas con contenido yodofórmico también exhiben un color marrón/gris a través del esmalte⁵¹.

• DE ORIGEN IDIOPÁTICO

Bien como respuesta a una infección, a una deficiencia nutricional o a un trauma en la dentición primaria de forma localizada, se puede dar lugar a una interrupción en el correcto desarrollo del germen permanente sucesor, que se manifiesta en forma de hipoplasia del esmalte, más o menos limitada a un tercio de la corona clínica o, en casos más severos, puede dar lugar al diente de Turner, donde la hipoplasia está distribuida en toda la corona⁵².

Aparte de ello, la caries se reconoce en sus estadios iniciales por la aparición de una mancha blancuzca en la superficie del esmalte que, a medida que progresa en su avance hacia la dentina, cambia su apariencia por una tonalidad que puede ser desde marrón amarillento hasta negro.

2.5.1.2. GENERALIZADAS

- AMELOGÉNESIS IMPERFECTA

Esta entidad es de tipo hereditario, originada por una perturbación en el proceso de depósito y calcificación de la matriz del esmalte o por incorrecta actividad de los ameloblastos. Si se manifiesta de forma hipoplásica o hipocalcificada, el color puede ser desde normal a blanco opaco-amarillo o pardo. Por el contrario, si la que predomina es la forma hipomadura, el tono es entre blanco/amarillo a pardo moteado⁵³.

- DENTINOGÉNESIS IMPERFECTA

Clínicamente, esta anomalía de tipo hereditario es debida a una alteración en la síntesis de procolágeno y presenta dientes de diferentes gamas, desde azul gris hasta amarillo-pardo u opalescente con brillo traslúcido⁵³.

- ALCAPTONURIA

Se trata de una enfermedad genética causada por la deficiencia de una enzima, la homogentisato dioxigenasa. A nivel dental se expresa produciendo un cambio en la tonalidad de los dientes a marrónáceo⁵¹.

- DISPLASIA DENTINARIA

Conjunto de trastornos a nivel dentinario, de etiología desconocida. En este caso, los dientes de leche muestran una apariencia similar a la de los dientes afectados por dentinogénesis imperfecta (azul-gris a amarillo-pardo)⁵³.

- PORFIRIA ERITROPOYÉTICA CONGÉNITA

De herencia autosómica recesiva, provoca un cambio de color entre amarillo a marrón rojo, pudiendo incluso llegar a ser rosa o púrpura⁵³.

- HIPERBILIRRUBINEMIA

Los productos de desintegración de la hemólisis en forma de acúmulos de bilirrubina y biliverdina dan lugar a un tono amarillo verdoso⁵⁴.

- SÍNDROMES DE ORIGEN SISTÉMICO

Varias son las entidades que pueden afectar al esmalte en desarrollo. Entre ellas se encuentran la epidermolisis bullosa, el pseudohipoparatiroidismo, el síndrome de Ehlers-Danlos y el raquitismo vitamina D dependiente⁵⁵.

- PIGMENTACIÓN TETRACICLÍNICA

Discromía adquirida que resulta en una coloración interna tras la administración de un medicamento de amplio espectro, ya que se incorpora junto con los iones de calcio del esmalte en fase de mineralización en forma de complejo ortofosfato estable. La discoloración es variada, abarcando tonos desde amarillo a gris/marrón⁵³.

- FLUOROSIS DENTAL

Representa la causa más común de discoloración intrínseca dentaria. Se produce como consecuencia de un exceso en la ingesta de flúor diario y su apariencia clínica varía en función de la severidad de la tinción, desde áreas de esmalte moteado hasta opaco, o esmalte de apariencia blanco lechoso hasta áreas negras/marrones en el mismo⁵¹.

- ENVEJECIMIENTO

Con el apósito de material dentinario en la corona dental, el color de los dientes permanentes se vuelve progresivamente más amarillento.

2.5.2. EXTRÍNSECAS

La discoloración de origen extrínseco o exógena es provocada por la deposición de pigmentos o detritus sobre la superficie dentaria.

2.5.2.1. DE ORIGEN BACTERIANO

- MATERIA ALBA Y/O SARRO

Se produce como consecuencia de la falta de cepillado durante unos días y está formado por bacterias, proteínas salivares, células epiteliales, restos alimenticios... (fig. 5). Al comienzo de su formación, el depósito blanco-amarillento que constituye la materia alba es fácil de desprender, aunque en ocasiones su grosor sea importante.



Fig. 5. Materia alba (fuente: autor).

Ya pasado cierto tiempo, la materia alba puede devenir en sarro o tártaro al calcificarse. Éste es más duro y espeso y se emplaza en localizaciones supragingivales (siendo entonces de color amarillo) o infragingivales (mayormente negro, aunque pudiendo presentar otros colores por la acción de distintos pigmentos). En este estado, es difícil su remoción por su adherencia a la estructura dental⁵⁶.

El tratamiento indicado es la profilaxis profesional y la educación y motivación en higiene oral⁵⁶.

• PIGMENTACIÓN VERDE

Esta pigmentación es originada por bacilos pirocianos y otros hongos de la cavidad oral. También se cree que es debida a depósitos derivados de la hemoglobina como resultado de la gingivitis. Normalmente aparece en individuos con mala higiene, mayormente en la infancia y la adolescencia. De grosor variable, suele desaparecer en adultos⁵⁶.

Normalmente se halla en el tercio gingival de la corona clínica dental. Parece extenderse desde el margen gingival hacia las cúspides o bordes incisales. Se muestra con mayor frecuencia en dientes superiores que en inferiores. No obstante, es posible que se manifieste de forma totalmente contraria, aunque es bastante extraño⁵⁷.

Hassan y Qasim⁵⁸, de 569 niños investigados de 5 años de edad, obtienen una prevalencia del 1,41% en segmentos anteriores y de 0,35% en segmentos posteriores.

La coloración puede variar desde el verde oscuro al verde claro, pasando por verde grisáceo o verde azulado⁵⁹.

En 1957, otros autores encuentran que los niños (n=1241) de 5 años de edad con estas tinciones (31,2%), tienen mayor porcentaje de dientes careados comparado con los niños que no muestran esta pigmentación⁶⁰.

El tratamiento apropiado en estos casos es la profilaxis profesional y la educación en higiene oral⁵⁶.

• PIGMENTACIÓN NARANJA

Sobre todo se sitúa en las áreas vestibulares de los dientes anteriores, a nivel cervical y con un color naranja intenso (fig. 6). Se relaciona esta tinción con microorganismos tipo Bacilo mesentérico ruber, Bacilo prodigioso, *Sarcina roseus*, *Flavobacterium lutescens*, etc. No es habitual que se observen en la cavidad oral y pueden encontrarse en uno o varios dientes⁵⁶.

La prevalencia de estas tinciones está en torno al 6% en 1273 niños de 11-13 años de edad⁶¹.

Para su remoción, al ser depósitos poco consistentes, está indicada la profilaxis profesional e instrucción y motivación en higiene oral⁵⁶.



Fig. 6. Pigmentación extrínseca naranja (fuente: autor).

• PIGMENTACIÓN NEGRA

Depósitos que se observan de forma más frecuente en la dentición temporal paralelos al margen gingival de los dientes, aunque su extensión puede llegar a ocupar la corona clínica dentaria en los casos más extremos (fig. 7). Es posible también hallarlos en la dentición permanente.

Aparecen independientemente del nivel de higiene oral y su remoción es de gran dificultad, necesitando de la ayuda de una profilaxis profesional para su completa eliminación.



Fig.7. Tinción extrínseca negra de origen bacteriano (fuente: autor).

2.5.2.2. DE ORIGEN NO BACTERIANO

- INGESTIÓN DE HIERRO Y COBRE POR VÍA ORAL

Es característica la coloración negra y verde/verde azulada de los dientes, respectivamente, si se toman soluciones orales de cobre y hierro⁶².

Estos depósitos no aparecen si se mantiene una buena higiene oral⁵⁶.

- TABACO

Se trata de una discoloración marrón oscuro a negro en el tercio cervical y medio de la mayoría de los dientes. En muchas ocasiones es difícil su remoción⁶².

- CLORHEXIDINA

El uso prolongado de la clorhexidina en el tiempo ocasiona una coloración marróncea de los dientes, debido a que la molécula de clorhexidina, cargada positivamente, se adhiere a la superficie de los dientes⁶².

- BEBIDAS

La ingestión en abundancia de determinadas bebidas como té, café, vino tinto, bebidas carbonatadas con colorantes, etc., origina un cambio de tonalidad en la superficie de los dientes en función de la bebida tomada⁶².

- FLUORURO DE ESTAÑO

Provoca un cambio en la tonalidad de los dientes a marrón dorado⁵¹. Esta tinción es generalmente temporal y se puede eliminar en gran parte con el cepillado oral.

2.6. MANCHAS DENTARIAS NEGRAS DE ORIGEN BACTERIANO

2.6.1. DESCRIPCIÓN CLÍNICA

Las manchas dentarias negras de origen bacteriano son depósitos exógenos en forma de puntos o líneas de color negro situados paralelamente al margen gingival de los dientes, en el tercio cervical, en las superficies bucal, lingual o palatina, sobre todo a nivel de los dientes posteriores, aunque también pueden aparecer en los dientes anteriores^{63,64,65,66,67,68}. En algunas ocasiones esta tinción puede extenderse más allá del tercio gingival, afectando fisuras y caras interproximales de las piezas dentarias⁶⁹. Se localizan primordialmente en la dentición primaria, aunque también pueden hallarse en la permanente⁹.

La primera clasificación de esta pigmentación fue descrita por Shourie⁷⁰, dándole valor de 1 a la ausencia de línea, valor de 2 a una línea formada por pequeños puntos que no llegan a confluir entre sí y valor de 3 a la presencia de una línea continua.

Posteriormente, esta primera clasificación es modificada por diversos autores. Koch considera como criterio para el diagnóstico de la tinción la presencia de puntos negros de un diámetro menor a 0,5 mm formando una discoloración lineal paralela al margen gingival en las superficies dentales de al menos dos dientes distintos sin esmalte dental cavitado⁷¹. Siguiendo las clasificaciones elaboradas por Shourie y Koch, Gasparetto también varía las mismas añadiéndole un criterio adicional basado en la extensión de la superficie dental afectada por esta tinción (fig. 8)⁷².

Esta última modificación es la más empleada actualmente en la mayoría de los estudios realizados al respecto. Así, en una población infantil compuesta por 39 niños con esta pigmentación, el 41% (n=16) presentan una puntuación de 3 (presencia de tinción más allá del tercio cervical de la superficie dental), seguido de aquellos (30,8%, n=12) que tienen una puntuación 2 (depósitos limitados a la mitad del tercio cervical formando una línea continua pigmentada) y, por último, con un 28,2% , hay 11 niños que exhiben una puntuación 1 (las líneas o puntos pigmentados paralelos al margen gingival no confluyen entre sí)⁷².

No se relacionan con la higiene y su intensidad de color es variable de unos pacientes a otros⁵⁶. Pueden dar en ocasiones sensación de arenilla si son muy abundantes, aunque por lo general son asintomáticas, llegando incluso a pasar desapercibidas por los individuos portadores si no están presentes en abundancia en la cavidad oral. Como además estas manchas se encuentran firmemente adheridas al esmalte, siendo muy complicada su remoción, a nivel estético presentan un problema importante².

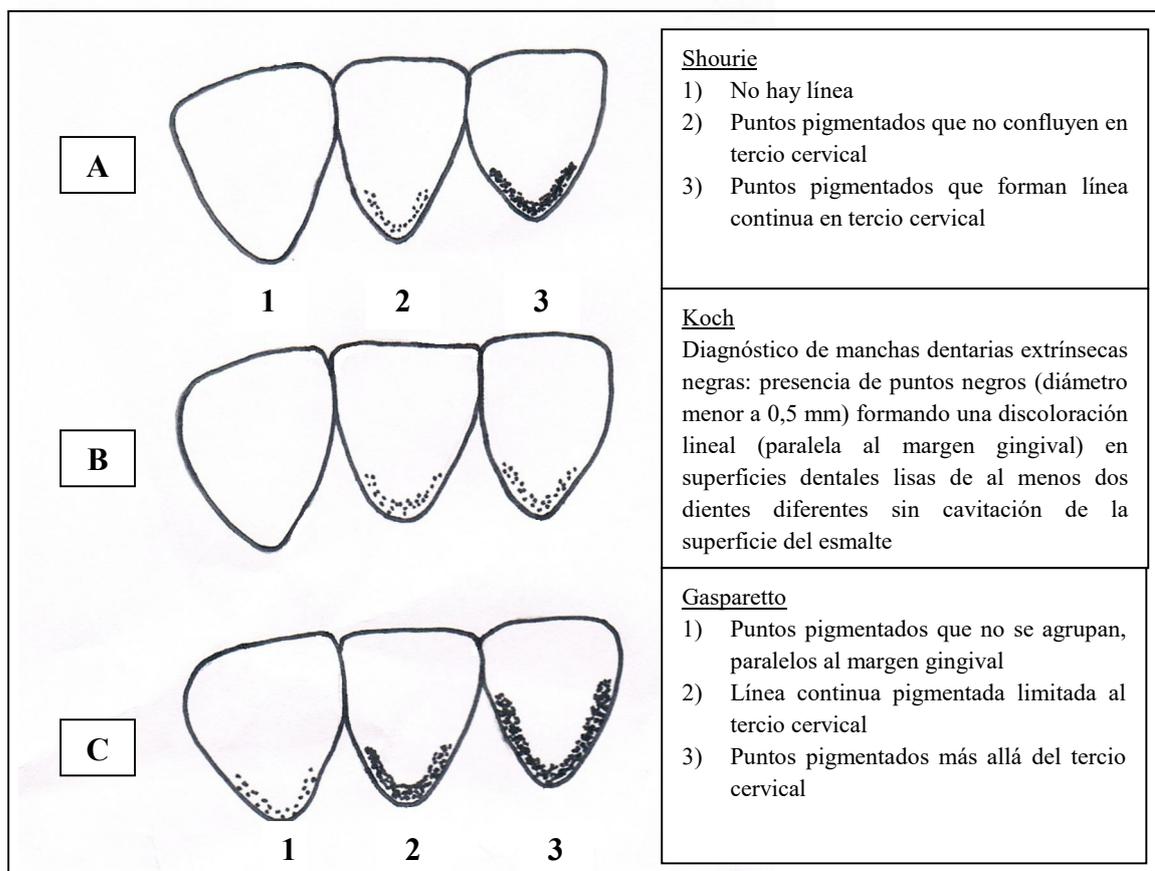


Fig. 8. Clasificación de la tinción extrínseca negra según Shourie (A), Koch (B) y Gasparetto (C)⁷³.

2.6.2. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Las tinciones extrínsecas en los dientes son muy comunes y pueden tener su origen en una amplia variedad de causas y factores. En general pueden ser eliminadas por el mismo paciente o por el propio odontólogo, mediante una profilaxis dental. La pigmentación extrínseca negra de origen bacteriano puede ser confundida en su diagnóstico con otros tipos de tinciones exógenas de similar apariencia clínica (tabla 2). Entre estas últimas, podríamos citar las lesiones por caries, el consumo de té o café o el hábito tabáquico.

La lesión por caries presenta una diferencia importante en su diagnóstico con respecto a la tinción cromógena dentaria. Así, mientras la segunda puede ser eliminada a través de la remoción mecánica y/o el pulido de la superficie dentaria, la primera necesita de la realización de un tratamiento restaurador para su eliminación completa.

Por otra parte, de igual forma es fundamental el diagnóstico diferencial con las tinciones provocadas por el consumo de té, pues presentan una imagen clínica similar. Estas coloraciones suelen aparecer de manera predominante en la población adulta y también por debajo del ecuador dentario como las manchas dentarias negras, pero en contraste se presentan en dientes con caras vestibulares abombadas y no en superficies más bien lisas⁶⁹.

De la misma forma, las manchas producidas por la acción del tabaco, cigarrillos, puros o pipa deben ser igualmente distinguidas. Para ello se debe tener en cuenta un historial clínico de consumo de estos productos mantenido en el tiempo y que se presentan en adultos, descartando la aparición en niños. También son difíciles de eliminar y su localización es, sobre todo, a nivel de los dientes anteriores.

Tras el uso de colutorios de clorhexidina por espacios de tiempo superiores a las 3 semanas, también se observan discoloraciones a nivel general de los dientes, aunque en este caso de una tonalidad marrón a amarillenta. Nuevamente es importante una detallada historia clínica y saber que la eliminación de las mismas suele ser más sencilla que la de las manchas extrínsecas negras de origen bacteriano.

Las tinciones producidas en aquellos dientes portadores de obturaciones de amalgama de plata se diferencian con las manchas extrínsecas negras en que la coloración de las primeras solo se observa en los márgenes de la restauración⁵⁶.

Igualmente, diferentes manchas localizadas que no se expresan a nivel general son las representadas por el uso de materiales odontológicos, tales como nitrato de plata (coloración negro-azulada, poco empleado en la actualidad), yodo (coloración marronácea), eugenol o compuestos fenólicos (marrón oscuro).

Otros componentes metálicos, como el hierro (pigmentación negra) o el potasio (coloración violeta a negra) pueden dar lugar a un diagnóstico equívoco. En estos casos se producen por ingesta de medicamentos (raramente) o por una exposición a estos elementos prolongada en el tiempo, que se asocia habitualmente a cuestiones laborales.

Color	Origen	Distribución	Tratamiento
Marrón	Depósitos de té, café, etc.	Vestibular molares maxilares, lingual incisivos mandibulares	Profilaxis dental
Marrón oscuro/negro	Tabaco	Tercio cervical a tercio medio corona clínica en la mayoría de los dientes	Profilaxis dental
Negro	Bacteriano	Tercio cervical a tercio medio, también en interproximal, en la mayoría de los dientes	Profilaxis dental
Verde	Bacteriano	Vestibular de dientes anteriores maxilares en tercio gingival	Cepillado o profilaxis dental
Naranja	Bacteriano	Vestibular de dientes anteriores maxilares o mandibulares en tercio cervical	Cepillado dental
Negro	Metales (hierro, manganeso, plata)	Toda la corona clínica	Profilaxis dental
Verde/verde-azul	Metales (cobre, níquel)	Toda la corona clínica	Profilaxis dental
Marrón	Yodo, fluoruro de estaño, eugenol	Toda la corona clínica	Profilaxis dental
Violeta/negro	Permanganato de potasio	Toda la corona clínica	Profilaxis dental
Marrón/amarillo	Clorhexidina	Surcos y fisuras, márgenes gingivales, puede extenderse a toda la corona clínica	Profilaxis dental
Gris	Amalgama dental	Márgenes de restauraciones	Sustitución amalgama por resinas compuestas o coronas
Marrón/negro	Caries (bacteriano)	Cualquier superficie dental	Eliminación de la caries y colocación de restauración
Blanco/amarillo	Materia alba, sarro	A nivel margen gingival, sobre todo en lingual incisivos inferiores mandibulares	Cepillado o profilaxis dental

Tabla 2. Tinciones extrínsecas y su tratamiento⁶².

2.6.3. COMPOSICIÓN DE LA PLACA

2.6.3.1. REVISIÓN DE LA LITERATURA

Las primeras bacterias pigmentadoras de negro fueron descritas en 1919 por Castellani y Chalmers, aunque el término de *Bacteroides melaninogenicus* fue acuñado por Oliver y Wherry en 1921. El pigmento característico producido en medio agar/sangre se pensó que era melanina, de ahí la denominación. A pesar de que hubo cambios en las denominaciones, se mantuvo la mencionada hasta 1970. Entrados los años 60, se comprueba la heterogeneidad química y serológica entre las cepas y los aislamientos reagrupados bajo esta denominación⁷⁴.

En consecuencia, en 1970, la especie *Bacteroides melaninogenicus*, dependiendo de su facultad de fermentación de los azúcares, se divide en tres subespecies: *Bacteroides melaninogenicus* subsp. *intermedius* para las fermentadores débiles, *Bacteroides melaninogenicus* subsp. *asaccharolyticus* para las no fermentadoras y *Bacteroides melaninogenicus* subsp. a partir de cepas extraorales y orales de bolsas periodontales de *Bacteroides asaccharolyticus*. Los datos serológicos y fisiológicos confirmaron la heterogeneidad de la especie mediante estudios de homología del ADN y fue creada la especie *Bacteroides gingivalis* en 1980, que agrupaba las cepas no fermentadoras de origen oral humano. En 1984, se creó la especie *Bacteroides endodontalis* a partir de las cepas no sacaroclásticas aisladas en infecciones pulpares.

A partir de 1988 se estableció un nuevo género, *Porphyromonas*, que reagrupaba las tres especies no sacaroclásticas y pigmentadoras de negro: *Bacteroides endodontalis*, *Bacteroides gingivalis* y *Bacteroides asaccharolyticus*. Un año después, se plantea incluir en el género *Bacteroides* solo las especies próximas al *Bacteroides fragilis*. Finalmente, en 1990, se proyecta la creación del género *Prevotella*, que abarca las especies sacaroclásticas próximas a *Bacteroides intermedius* y *Bacteroides melaninogenicus*, pigmentadas y no pigmentadas⁷⁴ (tabla 3).

Bacterias pigmentadoras no sacarolíticas	Bacterias pigmentadoras sacarolíticas
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	<i>Prevotella denticola</i>
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>Porphyromonas circumdentaria</i>	<i>Prevotella loescheii</i>
<i>Porphyromonas salivosa</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>Bacteroides macacae</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>

Tabla 3. Bacterias pigmentadoras de negro sacarolíticas y no sacarolíticas⁷⁴.

2.6.3.2. COMPONENTES DE ORIGEN BACTERIANO

Varios son los métodos que han empleado los distintos autores al analizar la composición de la placa bacteriana negra, entre ellos el microscopio de transmisión de electrones, para así poder observar la estructura de las membranas biológicas. Theilade y Pang⁷⁵ hallan que los microorganismos más frecuentes en esta placa son cadenas de bacterias gram-positivas y filamentos gram-positivos, sobre todo donde hay mayor cantidad de acúmulos bacterianos.

Las bacterias gram-positivas se adivinan en proceso de división. En las capas más profundas algunas muestran una delgada pared celular y en las más superficiales muestran vesículas de tamaños variados en su citoplasma. Estas vesículas están en conexión con el espacio extracelular.

Los filamentos gram-positivos están formados por segmentos cortos que, muchas veces, están rodeados por una vaina que agrupa los segmentos individuales de forma conjunta. Algunos, en lugar de segmentados, muestran extremos adelgazados. Otros exhiben un aspecto en forma de mazorcas de maíz por su unión a cocos gram-positivos. También cabe mencionar que se advierten células epiteliales y cocos gram-negativos⁷⁶.

Dentro de esta matriz intermicrobiana filamentosa o granular, en la interfase entre esmalte y el depósito, las bacterias se encuentran en contacto directo con los cristales del esmalte o separadas del mismo por una ancha capa⁷⁷.

Teniendo en cuenta la capa más superficial del esmalte se percibe que el depósito está notoriamente dividido en 2 partes: una externa con microorganismos (más prevalente en la periferia del depósito) y otra interna (normalmente en el centro del depósito) de coloración amarillenta a marrón. Aunque algunas capas no siempre están presentes, la capa interna opaca es la capa que más frecuentemente se observa en las porciones centrales de los depósitos y la capa de placa bacteriana es la más prevalente en la periferia de los mismos.

La capa bacteriana externa, dispuesta de forma perpendicular a la superficie del esmalte, está constituida por numerosos microorganismos filamentosos, que dan lugar al aspecto típico de placa madura. En algunas áreas, parece que la tinción esté cubierta por una capa constituida con mucha probabilidad por precipitados procedentes de la saliva.

La estructura interna exhibe también una superioridad de microorganismos filamentosos orientados más o menos de forma perpendicular a la superficie dental. En alguna parte la morfología de las bacterias está oscurecida en parte por una sustancia similar al cemento, posiblemente como resultado de la calcificación bacteriana. La calcificación inicial se advierte como pequeños agregados de cristales presentes en la matriz intermicrobiana y dentro de los microorganismos, bien en contacto con la membrana citoplasmática dentro de la pared celular, en los mesosomas del citoplasma o a través del mismo. Incluso, en algunos lugares, la calcificación es tan avanzada que la matriz intercelular está casi completamente ocupada por cristales densos.

De forma específica, las bacterias que componen esta placa en individuos con manchas extrínsecas negras de origen bacteriano no difieren de las halladas en individuos sin ellas.

Así, en *biofilms* de pacientes portadores de ortodoncia con manchas extrínsecas negras, Teixeira⁷⁸ no encuentra diferencias significativas en las bacterias estudiadas (*P. nigrescens*, *P. intermedia*, *Actinomyces* spp. y *S. mutans*).

Entre las especies no pigmentadas, el *S. mutans* exhibe similares resultados (23,1% en portadores de manchas negras y 19,2% en grupo control).

El recuento de *S. mutans* y de *Actinomyces* spp. no ofrece tampoco importantes discrepancias entre individuos sin y con tinción para los mismos autores⁷⁹. Entre otras bacterias detectadas en sujetos con manchas, *P. nigrescens* es la más frecuentemente observada (30,7%, 8/26), seguida de *P. intermedia* (3,8%, 1/26), aunque también sin resultados significativos comparado con el grupo control, lo que insinúa una similar colonización del *biofilm* dentario en ambos grupos.

También se detecta la presencia de *P. gingivalis*, *P. melaninogenica*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* y *A. actinomycetemcomitans* en el informe de un caso de un paciente de 10 años con estas pigmentaciones⁸⁰.

Otras bacterias observadas en muestras de placa de individuos entre 3 a 10 años de edad con las pigmentaciones negras son *A. naeslundii* y *P. gingivalis*. Además, hay *F. nucleatum* y *Lactobacillus* spp. Donde no se aprecian diferencias importantes es en el recuento de *S. mutans*, *S. sobrinus*, *P. intermedia* y *A. actinomycetemcomitans*⁸¹(tabla 4).

Con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, no se advierte la presencia de *P. gingivalis* y *P. melaninogenica*, tanto en el grupo control como en el otro de individuos con manchas. Por el contrario, está demostrada la implicación de *Actinomyces* en el crecimiento de la pigmentación, ya que se halla en el 50% de los pacientes. Además, el 70% de los individuos son positivos para *A. actinomycetemcomitans*, versus el 20% de los pacientes del grupo control⁸².

Las cifras que maneja García⁸³, con la misma técnica, son de un 33% de prevalencia de *Actinomyces* para una muestra de 30 dientes, seguido de un 12,62% para el género *Streptococcus*. Este autor añade que tiene un porcentaje de un 6,8% que representa a una bacteria no caracterizada, pero que es importante destacar.

En concreto, según la especie, *Actinomyces naeslundii* es la que más predomina (17,48%), seguido de *Actinomyces oris*, *Veillonella parvula* y *Streptococcus sanguinis* (3,88%). En pequeños porcentajes se puede identificar *Porphyromonas* spp. y *Porphyromonas catonial*. Al no observar *Bacteroides* o *Prevotella*, concluyen que estas bacterias no están relacionadas con la pigmentación.

Con la misma técnica, hay un mayor volumen de bacterias del género *Actinomyces* spp. en niños con manchas negras comparado con un grupo control, por lo que se cree posible también su implicación en el depósito de la pigmentación. Otros filotipos bacterianos más abundantes en estos niños fueron los siguientes: *Cardiobacterium* spp., *Haemophilus* spp., *Corynebacterium* spp., *Tannerella* spp. y *Treponema* spp. Recalcan, empero, que no hay diferencias significativas entre los 2 grupos para *P. intermedia* y *A. actinomycetemcomitans*. En general, manifiestan que la diversidad microbiana es menor en los niños con pigmentaciones, tanto a nivel de saliva como en la placa negra⁸⁴.

Entre las bacterias pigmentadoras de negro aisladas en otras localizaciones, la *P. nigrescens* es la que con mayor frecuencia se aísla de los segmentos apical y coronal de conductos radiculares infectados. *P. intermedia* solo se detecta en el segmento apical de un conducto radicular^{85,86,87}.

Otros autores interesados en la microbiología de esta placa negra, estudiaron si había correlación entre ésta y la composición salival de los individuos y hallaron que es mayor la población de *Actinomyces* en saliva, pero sin llegar a ser estadísticamente significativo. Consideran, por tanto, que es probable su participación en la formación del pigmento, pero que estaría influido también por otros factores⁸⁸.

En la siguiente tabla se describe la microbiología de la tinción en la placa dental según los diferentes autores (tabla 4).

Autores	Lugar de la toma de la muestra	Microorganismos presentes en la tinción
Saba y cols. ⁸²	Placa dental	<ul style="list-style-type: none"> - <i>P. gingivalis</i> - <i>P. melaninogenica</i> - <i>Actinomyces</i> spp. - <i>A. actinomycetemcomitans</i>
Bartsch ⁸⁹	Placa dental	<ul style="list-style-type: none"> - <i>A. naeslundii</i> - <i>S. mutans</i> - <i>Lactobacillus</i> spp.
Teixeira y cols. ⁷⁹	Placa dental	<ul style="list-style-type: none"> - <i>P. nigrescens</i> - <i>P. intermedia</i> - <i>Actinomyces</i> spp. - <i>S. mutans</i> - <i>P. nigrescens</i> - <i>P. intermedia</i>
Heinrich-Weltzien y cols. ⁸¹	Placa dental	<ul style="list-style-type: none"> - <i>A. naeslundii</i> - <i>P. gingivalis</i> - <i>F. nucleatum</i> - <i>Lactobacillus</i> spp. - <i>S. mutans</i> - <i>S. sobrinus</i> - <i>A. actinomycetemcomitans</i> - <i>P. intermedia</i>
Li y cols. ⁸⁴	Placa dental	<ul style="list-style-type: none"> - <i>P. intermedia</i> - <i>A. actinomycetemcomitans</i> - <i>Cardiobacterium</i> spp. - <i>Haemophilus</i> spp. - <i>Corynebacterium</i> spp. - <i>Tannerella</i> spp. - <i>Treponema</i> spp.
Pessoa y cols. ⁸⁰	Placa dental	<ul style="list-style-type: none"> - <i>P. intermedia</i> - <i>A. actinomycetemcomitans</i> - <i>P. melaninogenica</i> - <i>P. intermedia</i> - <i>P. nigrescens</i>

Tabla 4. Microorganismos presentes en manchas extrínsecas negras de origen bacteriano en la placa dental.

- BACTERIAS PIGMENTADORAS DE NEGRO

Estas especies son denominadas pigmentadoras de negro porque producen un pigmento negro en sus colonias cuando son cultivadas en laboratorio con medios agar/sangre, hemina y vitamina K. Esto es debido a la presencia de hemina y protoporfirina. La hemina es indispensable para el crecimiento de las mismas tanto *in vivo* como *in vitro*.

- *Prevotella nigrescens*

Presente en la microbiota subgingival de uno de cada dos individuos con buena salud periodontal, aumentando su presencia en tres de cada cuatro individuos con periodontitis⁷⁴.

Formadora de colonias de color negro en placas de agar sangre. Con morfología de bastón, gram-negativa, anaerobio obligado y no esporulado. Las superficies de las colonias después de 3 días en agar sangre son circulares, de 0,5 a 2 mm de diámetro, ligeramente convexas y de color marrón a negro y las células tienen una anchura entre 0,3 a 0,7 μm por una longitud de 1 a 2 μm . La pigmentación ocurre habitualmente en la periferia de las colonias, mientras que el centro es de color crema a marrón oscuro. Bajo radiación ultravioleta (365 nm) muchas colonias exhiben una fluorescencia de color rojo brillante.

Algunas cepas son débilmente hemolíticas y unas pocas son α -hemolíticas. Los pigmentos producidos mayoritariamente son protohemina y protoporfirina⁹⁰.

- *Prevotella intermedia*

Bacilos gram-negativos, inmóviles, pleomórficos, moderadamente fermentativos. Anaerobio obligado. Sus colonias en agar sangre son lisas, pequeñas, circulares, translúcidas u opacas, grises o con pigmentación marrón o negra.

Se aísla con mucha frecuencia de abscesos periapicales, alveolitis, osteítis periimplantarias e infecciones pulpares. Tiene actividad peptidasa y lipasa. Su hábitat primario oral se encuentra en el surco gingival^{74,91}.

○ *Prevotella melaninogenica*

Con las mismas características principales que la anterior. Se han descrito fimbrias que intervienen en la coagregación bacteriana y la adhesión, y residuos proteicos y glucoproteicos superficiales, como receptores de otras adhesinas⁷⁴.

○ *Porphyromonas endodontalis*

Gram-negativo, anaerobio obligado, con morfología de bastones no móviles o cocobacilos y no formador de esporas. Las colonias en agar sangre son lisas, convexas y circulares, desarrollando pigmentación negra a los 7-14 días. La protohemina es el pigmento principal, pero también hay protoporfirina. La temperatura óptima para su crecimiento es de 37°C⁹². La hemólisis es visible en medio de agar/sangre después de la incubación durante 24 horas al aire⁹³.

Se puede aislar de infecciones pulpares, abscesos periapicales y, en ocasiones, en bolsas periodontales. Sobre todo se localiza en las mucosas orales (lengua y amígdalas). Fabrica productos tóxicos como el butirato y el propionato, que impiden el crecimiento de las células tisulares. Es autóctona de la cavidad oral, aunque sus proporciones son minoritarias⁷⁴.

○ *Porphyromonas gingivalis*

Bacilos o cocobacilos gram-negativos e inmóviles de 0,5-1,2 µm de diámetro. Son asacarolíticos, producen ácido fenilacético y tienen actividad de hemaglutinación y seudotripsina. Las colonias en agar sangre son lisas, convexas, circulares, brillantes, y producen un pigmento marrón oscuro o negro tras varios días de incubación.

Se localizan en el surco gingival, especialmente cuando no hay buena salud periodontal, por ello se les considera un agente patógeno mayor de las periodontitis, aunque otros nichos son la saliva, lengua y amígdalas. Relacionados con infecciones endodontales, abscesos periapicales y periodontales, con la destrucción y progresión de la periodontitis y con la gingivitis^{74,91}.

Raramente hay formación de colonias no pigmentadas. El pigmento que más se produce es la protohemina, aunque es posible hallar trazas de protoporfirina⁹².

• OTRAS BACTERIAS PRESENTES EN LA TINCIÓN

Aunque no son productoras del pigmento negro característico de la tinción exógena, estas bacterias se agrupan presentando una morfología muy similar a la de la placa dental, como describieron algunos autores al examinar la ultraestructura y composición de las pigmentaciones cromógenas en dientes primarios. La diferencia entre ambas es el mayor número de bacilos gram-positivos que se hallan en la tinción negra de origen bacteriano⁷⁷.

La colonización de la placa bacteriana consta de varias etapas, como la deposición, adhesión, coagregación, crecimiento y reproducción de las bacterias adheridas a la película adquirida. Así, el *S. sanguis* inicia la colonización microbiana y después lo hace el *Actinomyces viscosus*. Se cree que estos microorganismos facilitan la colonización posterior de *Veillonella* y *Fusobacterium*. A los siete días de la formación de la placa dental, debido a los cambios de oxígeno que hay en el ambiente, otras bacterias secundarias, como *P. intermedia*, *F. nucleatum* y *P. gingivalis*, entre otras, se adhieren a las bacterias ya presentes en la placa dental¹⁷.

○ *Actinomyces naeslundii*

Bacilos gram-positivos, inmóviles y no esporulados. Adoptan distintas morfologías, desde formas filamentosas, cocobacilares, rectas, curvas o con ramificaciones.

Pueden presentarse aisladamente, en empalizadas o en cadenas cortas. Son anaerobios facultativos, proliferando sobre todo en ambientes con altas concentraciones de CO₂. Tras 7-14 días de incubación, las colonias pueden variar desde gris-blanquecino a color crema y son secas, se rompen fácilmente y adherentes o de textura lisa y mucoide. Para crecer necesitan una temperatura de 36±1°C, aunque pueden soportar temperaturas de hasta 42°C. Los medios de cultivo apropiados son agar sangre, infusión corazón-cerebro y caldo tioglicolato.

Su hábitat principal es la cavidad oral, aunque también se pueden hallar en las criptas amigdalares y el tracto genital femenino. Produce periodontitis con destrucción del hueso alveolar y tiene capacidad de coagregarse con bacilos gram-negativos periodontopatógenos y con cocos gram-positivos⁹⁴.

○ *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Bacilo o cocobacilo gram-negativo e inmóvil. Crece en medios con suero o sangre en condiciones anaerobias o en entorno aerobio con 5-10% de CO₂. Produce catalasa y superóxido dismutasa. Las colonias son pequeñas, lisas, grisáceas o blanquecinas, adherentes y no hemolíticas en agar sangre. Es capaz de fermentar la glucosa, la fructosa y la maltosa. En la cavidad oral se halla en las placas supra y subgingival y la mucosa bucal. Está relacionado con distintas formas clínicas de periodontitis y su progresión⁹⁴.

○ *Fusobacterium nucleatum*

Bacilos gram-negativos muy pleomórficos. Pueden tener desde aspecto fusiforme, como redondeado o fino, y con extremos romos. Inmóviles y con hábitat primario en el surco gingival. Sus colonias tienen aspecto cónico, con punteado en su superficie⁹⁴.

○ *Lactobacillus spp.*

Bacilos gram-positivos no ramificados, pudiendo presentar distintas morfologías, desde alargadas, bacilos cortos e incluso cocoides.

Habitualmente inmóviles y aparecen aislados, asociados o en parejas, empalizadas o en cadenas. Para crecer de forma óptima, precisan de una atmósfera anaerobia, aunque también lo pueden hacer cuando hay bajas concentraciones de oxígeno (de un 5-10% de CO₂)⁹⁵.

○ *Streptococcus mutans*

Son capaces de producir polisacáridos extracelulares a partir de la sacarosa. Con gran afinidad por las superficies dentales y debido a la facultad de producir polisacáridos intracelulares y de metabolizarlos, hace que sean especialmente virulentos. Son productores de ácido y acidófilos⁹⁶.

○ *Streptococcus sobrinus*

Forma colonias más lisas que el *S. mutans*. Capaz de producir peróxido de hidrógeno y glucanos insolubles y solubles, pero no fructanos. Tampoco sintetiza polisacáridos intracelulares y se halla en proporciones inferiores al *S. mutans* a nivel supragingival⁹⁶.

2.6.3.3. COMPONENTES DE ORIGEN NO BACTERIANO

Esta alteración extrínseca del color presenta una composición mezcla de residuos y placa dental, entre la cual se encuentran iones de hierro, calcio y magnesio⁶⁷. Aparte, son observables carbono, oxígeno, silicio, azufre, cloro, potasio y fósforo⁹⁷.

En los análisis de otro estudio publicado, se observa la presencia de iones metálicos (hierro, cobre, titanio, aluminio y zirconio), hecho atribuido al empleo de curetas de metal para la recogida de muestras. Las cantidades de carbón, oxígeno, sodio, magnesio, silicio, azufre, cloro y potasio no difieren sustancialmente con los resultados del grupo control, pero sí la cuantía de calcio y fósforo, presumiblemente debida también a la manera en la que son obtenidas las muestras. El calcio y el fosfato son dos componentes principales de la hidroxiapatita que pueden ser arrastrados durante el curetaje de las manchas⁹⁸.

Según distintos autores la tendencia más elevada a la calcificación de esta línea mesentérica es debida a la mayor proporción de calcio y fósforo, los cuales contribuyen a una reducción en la disolución del esmalte y a un aumento en la capacidad tampón⁹.

El mecanismo que provocaría la calcificación puede seguir dos caminos distintos: bien mediante la nucleación heterogénea (gracias a altas concentraciones de calcio y fósforo en el medio tiene lugar la precipitación de sales minerales sobre la superficie de la placa bacteriana) o, más probablemente en este caso, mediante núcleos de calcificación.

Se considera que estos depósitos pueden ser clasificados como placa dental, puesto que su tendencia a la calcificación sigue el mismo proceso. Daría a entender, por tanto, que el nivel de pH es bastante estable⁷⁷.

Estos núcleos se forman a partir de la matriz intermicrobiana constituyente de la placa bacteriana que contiene lipoproteínas que atraen los iones de calcio o a partir de restos de bacterias muertas de las capas profundas de la placa, las cuales tienen sobresaturación de fósforo en su interior que produce sales de calcio al unirse al calcio extracelular de la saliva.

De esta forma, las bacterias pigmentadoras de negro quedarían integradas en esta matriz y la discoloración extrínseca negra adoptaría la forma de placa dental, con sus mismas características¹⁸.

2.6.4. MECANISMO DE PRODUCCIÓN DEL PIGMENTO

Los *biofilms* dentales maduros están formados por torres de microorganismos en las cuales las bacterias residentes interactúan unas con otras. La aparición de la placa dental conlleva la llegada de los colonizadores primarios, predominantemente *Actinomyces* y *Streptococcus*, los cuales proveen sitios de unión para la cohesión con otras bacterias.

Se piensa que *Fusobacterium nucleatum* juega un papel crucial en la maduración de la placa dental porque establece coagregados con casi todas las bacterias orales, tanto colonizadores primarios como tardíos, por ejemplo *Eubacterium* spp., *Treponema denticola* o *Tannerella forsythia*. A medida que el *biofilm* crece en complejidad, se crean distintos microambientes en su interior que dan lugar a nuevos nichos para los colonizadores tardíos, incluyendo patógenos periodontales, como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*⁹⁵.

Para lograr este crecimiento, las bacterias que forman el *biofilm* se sirven de diferentes mecanismos. Entre ellos, la saliva constituye la mayor fuente de nutrientes. Al tratarse de una mezcla de proteínas complejas y glicoproteínas, no son digeridas fácilmente por las bacterias. De esta manera, para poder ser degradadas de forma eficaz, es necesaria la actividad simultánea de muchas enzimas, y el conjunto de microorganismos está mejor preparado para llevar a cabo esta tarea que las distintas especies por separado¹⁰⁰.

Otra fuente potencial de nutrientes proviene del fluido crevicular gingival. Las áreas interproximales y el surco gingival protegen a los microorganismos de las fuerzas normales de remoción que existen en la cavidad oral, tales como las generadas por la masticación, el flujo salival y la higiene oral. Ambos sitios tienen un bajo potencial *redox* y, además, la región del surco gingival está bañada por el fluido crevicular gingival, el flujo del cual aumenta durante la inflamación y en la enfermedad periodontal. En consecuencia, estas áreas soportan una mayor diversidad microbiana, incluyendo grandes proporciones de bacterias anaerobias obligadas⁸.

El fluido crevicular gingival contiene no solo componentes de las defensas del huésped (anticuerpos y células fagocíticas), también proteínas y glicoproteínas que actúan como nutrientes para las bacterias que residen en el surco gingival, como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Tannerella forsythia*. Muchos de estos microorganismos son proteolíticos y degradan estas complejas moléculas mediante la elaboración de metano, CO₂, sulfuro de hidrógeno o dihidrógeno.

Los cofactores esenciales (como la hemina para las bacterias anaerobias pigmentadoras de negro) se obtienen de la degradación de productos del huésped que contienen hemina, como hemopexina, hemoglobina y haptoglobina.

Las superficies lisas están más expuestas al ambiente y solo se pueden colonizar por un número limitado de especies adaptadas a las condiciones extremas. Los hoyos y fisuras de las superficies oclusales proporcionan más protección frente a los cambios ambientales y, por añadidura, son susceptibles a la retención de restos alimentarios. Por ello, pocos son los anaerobios que proliferan en estos lugares y la microflora está compuesta sobre todo de bacterias gram-positivas, especialmente *Streptococcus*⁸.

La coagregación bacteriana también es importante en la formación del *biofilm*. Así, por ejemplo, la capa S de *Tannerella forsythia* es importante para la colonización en el surco gingival y está asociada con la enfermedad periodontal, ya que contribuye a la coagregación bacteriana, con bacterias tales como *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum*¹⁰¹.

El mecanismo de producción de las pigmentaciones extrínsecas negras no es concluyente. Una posible hipótesis que explicara la formación de estas pigmentaciones exógenas sería la proveniente de la elaboración de sulfuros de metal. Un requisito indispensable para ello implicaría la desnaturalización de las proteínas de la película adquirida, lo que acarrearía la rotura de los puentes de disulfuro dando lugar a grupos sulfhidrilo que reaccionarían con el hierro o zinc para dar lugar a componentes pigmentados (marrón, amarillo)¹⁰².

Los análisis a nivel ultraestructural de este pigmento confirman que se trata de una mezcla de cocos y cocobacilos gram-positivos con una cantidad no muy grande de bacilos gram-negativos. Adyacente al esmalte se observa, asimismo, una zona de células muertas¹⁰³.

El crecimiento bacteriano de las diferentes especies posiblemente implicadas en la etiología de este fenómeno requiere de un medio de cultivo que participe en este proceso. Doce de catorce cepas de *Bacteroides melaninogenicus* aisladas de la cavidad oral por Gibbons y MacDonald¹⁰⁴ precisan de hemina para su crecimiento.

Cuando *B. melaninogenicus* es cultivado en un medio que contiene sangre, observa Duerden, las colonias adquieren un color marrón oscuro¹⁰⁵. Tracy realiza análisis químicos a esta pigmentación y encuentra que posee las características del sulfuro de hierro coloidal. Por ello se observa el cambio de coloración, ya que el sulfuro ferroso se oxida rápidamente en sulfuro férrico de tonalidad marrón¹⁰⁶.

El pigmento puede ser intracelular o asociado a la célula de forma que no consigue ser eliminado con el lavado con agua, a pesar que el pigmento es soluble en la misma y puede ser extraído en solución acuosa tras el tratamiento con ultrasonidos. Aparte, éste tiene un pico de absorción con espectrometría a 410 nm, coincidente con la misma longitud de onda de la hemoglobina. Se advierte que la protohemina es un componente principal de estas colonias, variando su cantidad desde 10 mg de protohemina/g de células secas a los 4 días a 26 mg/g a los 5 días y, finalmente, a los 35,5 mg/g a los 9 días.

La protohemina solo se forma en pequeñas cantidades. El cultivo de la subespecie *melaninogenicus* (VPI9085 y WAL2728) a la luz ultravioleta exhibe una fluorescencia roja después de 1-2 días de crecimiento con medio agar sangre. El integrante principal de estas colonias es la protohemina, pero también hay protoporfirina. El ratio hemina/porfirina desciende de 25 (tercer día) a 7,7 (décimo día)¹⁰⁴.

Las colonias de la subespecie *intermedius* (T588), en cambio, a los 3-4 días se contemplan de un color negro oscuro, pero son más pequeñas, β -hemolíticas y rugosas, siendo rojo fluorescente débilmente en la parte central de las colonias jóvenes. Su constituyente primordial es la protoporfirina, cuya cuantía asciende desde 2,6-3,0 mg/g de células secas a los 3 días hasta un máximo de 6,8-7,3 mg/g de células secas a los 7 días.

El pigmento de hemina asociado con *P. intermedia* y *P. nigrescens* se adhiere firmemente a las paredes celulares. Este cambio de coloración a negro resulta de una variación hipercrómica en el espectro debido al aumento en la concentración del hierro monomérico (III) protoporfirina IX³.

La *P. intermedia* se une a la hemoglobina humana gracias a un receptor con gran afinidad, que no competiría con el receptor que usa este microorganismo para captar la misma cuando es cultivado en presencia de hemina, indicando que la célula posee más de un mecanismo para el consumo de hierro⁵. Este receptor es la proteína 60-kDa que se encuentra en la fracción de la membrana externa insoluble de Sarkosyl¹⁰⁷.

En un estudio publicado por estos últimos autores en 2006, observando la degradación de la hemoglobina en dos cepas distintas de *P. intermedia*, ATCC 49046 y ATCC 25611, se percata que el 30% de la misma sufre este proceso a los 30 minutos, a las 6 horas este porcentaje llega al 80% y, a las 20 horas, no queda ningún resto de esta molécula. La actividad de desintegración es mayor con el descenso del pH, siendo óptima con un pH 5. Esto implica que, en un medio acidificado, la proteasa que participa en este proceso, sería más activa con niveles bajos de pH¹⁰⁸.

Leung y Folk¹⁰⁹ señalan que el hierro de la hemina es fundamental para el crecimiento de *P. intermedia*, pero es incapaz de procesar formas inorgánicas de hierro o lo hace de forma ineficaz. Sugieren también que *P. intermedia* también crece en presencia de porfirinas y que la protoporfirina IX podría sustituir a la hemina en el desarrollo de esta bacteria.

Bajo la influencia del calor, por otra parte, este fenómeno disminuye. En condiciones oxidantes, *P. intermedia* produce ligeramente mayor cantidad de hemoglobina que en ambiente reductor. Son diferentes los mecanismos que están implicados en la unión a la hemina y a la hemoglobina¹⁰⁷.

La producción del pigmento durante el cultivo de *P. nigrescens* ATCC 33563 y *P. intermedia* ATCC 25611 desvela una degradación proteolítica parcial de la transferrina, sobre todo una vez que el cultivo ha llegado a la fase de crecimiento estacional, de lo cual se deduce que el crecimiento de esta bacteria en presencia de esta proteína del plasma como fuente de hierro no es relevante.

La transferrina restituye los iones de hierro que no se encuentran disponibles para las bacterias, desempeñando un papel trascendental en los mecanismos de defensa del huésped, al provocar la solubilización del hierro (Fe^{3+}) y su liberación desde los lugares de almacenamiento y absorción a los lugares donde es empleado. *P. nigrescens* y *P. intermedia* crecen en presencia de holotransferrina, pero no de apotransferrina, hecho que hace pensar que ambas especies pueden obtener hierro de la transferrina del plasma. *P. nigrescens* crece en presencia de suero humano, pudiendo por tanto ser resistente a la actividad bactericida del suero y es capaz de usar el área de unión a la transferrina presente en el fluido crevicular gingival encontrado en las bolsas periodontales.

Además de ello, es evidente la actividad de unión a la transferrina en ambas bacterias. En *P. nigrescens* se desarrolla este proceso gracias a la proteína 37-kDa que se encuentra en su superficie. El tratamiento de las células con enzimas proteolíticas tales como tripsina, proteinasa K, etc., y el cultivo de las mismas en presencia de hemina se relaciona con un marcado descenso de la actividad de unión a la transferrina.

Este proceso se produce sobre todo en niveles de pH bajos (4,5 a 6), siendo menor en pH neutro y prácticamente insignificante en pH alcalino¹¹⁰. Lo mismo ocurre para *P. gingivalis*.

P. gingivalis W50, después de ocho días de crecimiento en medio agar sangre, forma colonias de un color negro-verdoso y, tras 7 días más de incubación, éstas se vuelven negro oscuro³.

Bajo diferentes condiciones ambientales, *P. gingivalis* W50 aumenta su unión a la ferriprotoporfirina IX si las células están en un medio con exceso de hemina en condiciones oxidantes que si las mismas tienen limitado el acceso a esta molécula. Si cambia el entorno a reductor, las capacidades de unión a la hemina crecen en ambos casos.

Las colonias de *P. gingivalis* W50 presentan un pH de aproximadamente 7,5. El pH decrece aproximadamente a los 6 a 8 días durante el crecimiento en medio agar sangre. La disminución del pH resultaría en una adición de protones a las cadenas laterales carboxilo-hemina, aminorando radicalmente la solubilidad y favoreciendo el apósito de una capa insoluble encima y alrededor de la célula de iones de hierro protoporfirina IX en la forma monomérica¹¹¹.

Marsh¹¹² explica que la liberación de hemoglobina y transferrina y su posterior aprovechamiento por parte de muchas bacterias anaerobias y de bacterias proteolíticas que las usan como nutrientes esenciales, se produce en procesos tales como la gingivitis y periodontitis.

Cuando hay acumulación de placa en exceso, la respuesta inflamatoria local se traduce en un incremento del fluido gingival crevicular como respuesta a esta inflamación (desde donde se liberan estas moléculas), junto con aumento de sangrado, de pH y de temperatura. Este fluido es usado por los anaerobios proteolíticos que pueden actuar potencialmente como patógenos periodontales, aprovechándolo como una fuente primaria de nutrientes.

En consecuencia, las bacterias gram-negativas, que contienen lipopolisacáridos, ven elevado su número. Después hay una bajada del potencial *redox* y las proteasas que se producen desregulan la respuesta inflamatoria del huésped, agravando aún más la situación.

2.6.5. PREVALENCIA

Las diferencias existentes a nivel mundial en la prevalencia de este fenómeno podrían tener origen genético o cultural, de acuerdo con Bartsch⁸⁹. Así, la prevalencia de aparición de esta pigmentación en niños (12 a 15 años) en Moradabad (India) es del 20%, porcentaje del cual el 47,4% corresponde al sexo femenino y el 52,5% al masculino⁶⁷. En Estambul (Turquía), las cifras son algo menores, de un 18,5% en una muestra de 325 niños de 5 a 13 años de edad (167 niños y 158 niñas)¹¹³. La proporción de población infantil (6 a 12 años) afectada en Santa Terezinha de Itaipu (Brasil) es menor (5,75%), siendo 14 niñas (67%) y 9 niños (33%) los portadores de estos depósitos¹¹⁴. En otra población brasileña del mismo estado se extrae un porcentaje algo mayor, un 14,8% (n=263) entre niños del mismo período de edad⁷². De ellos, 19 son niños y 20 niñas. Mellanby y Coumoulos⁵⁷ alcanzan porcentajes parecidos en niños de 5 años de edad procedentes de escuelas en Londres (10,6%).

Similares cifras se obtienen (11,6%) en una población de niños de 6-12 años (n=267) en San Juan de la Costa (Chile). La distribución según el género es de 15 casos en niños (48,4%) y 16 en niñas (51,6%)¹¹⁵.

Otro estudio encuentra que, de 801 niños entre 6 a 11 años, 30 (4% del total) son los que exhiben esta coloración en la superficie dentaria (17 niños y 13 niñas) en Ladenburg, Oftersheim, Schwetzingen Nord y Schwetzingen Süd (Alemania)⁶⁹. En un lugar distinto de este país (Rhein-Kreis Neuss), este porcentaje es menor, del 1,5% (113/7624)⁸⁹. Una prevalencia similar (3,1%) es observada en una muestra de 3272 niños de 6 años de edad, donde 3058 niños (3,9%) son nativos (Oviedo, España) y 214 (1,9%) inmigrantes, aunque entre los dos grupos la disparidad no es importante ($p=0,416$)¹¹⁶.

En Valencia, las cifras obtenidas por algunos autores son bajas (2,4%)¹¹⁷, aunque la prevalencia total hallada por Paredes y Paredes¹¹⁸ es mayor (7,54±1,6%), con un intervalo de confianza de incidencia en la población entre 6,0-9,1%.

De forma similar, de una muestra de 1086 niños entre 6-12 años en Potenza (Italia), el 6,3% presentan esta tinción⁷¹ y, en Baghdad, según Hassan y Qasim⁵⁸, el porcentaje de estas manchas en dientes anteriores para una muestra de 569 niños de 5 años de edad es del 8,44% y, en dientes posteriores, del 2,64%.

Valorando las superficies afectadas, se obtiene un 18,04% como promedio por paciente (tamaño muestral total: 433 sujetos; prevalencia mancha dentaria negra: 4,2%)¹¹⁹.

En el Servicio de Odontopediatría del Hospital Central Fuerza Aérea del Perú, Mayta-Tovalino y Torres-Quevedo¹²⁰ hallan que el 6,49% (n=12) de 185 niños evidencian estas pigmentaciones. Una baja prevalencia (4,16%) de esta afección se encuentra en Rosario (Argentina), de un total de 433 niños examinados entre 3 y 10 años de edad¹¹⁹. Una cifra aproximada (5,8%) de entre 260 niños, es la que logran Mahmoodian y Hashemi¹²¹, lo que es atribuido a las diferencias en el estado de higiene oral y un aumento en el número de antibióticos empleado (provocaría cambios en la microbiota oral y, en consecuencia, una merma en las bacterias cromógenas) o por la administración de suplementos de hierro en forma de gotas.

Una de las tasas más altas de aparición de este fenómeno (16%) es la alcanzada en Northern Mindanao (Filipinas)² (n=1748), con una media de edad de los niños de 11,7±1,1 años. La otra se contempla en la ciudad de Udaipur (India), con una prevalencia del 18% entre niños en edad escolar (9,3±1,9 años)¹²². En Shanghai (China), la prevalencia de niños con pigmentaciones extrínsecas negras es del 9,9% (n=1397)¹²³. La tabla 5 muestra un resumen comparativo de las diferentes prevalencias obtenidas en los distintos estudios.

Autores	Edad individuos de la muestra y tamaño muestral	Localización del estudio	Prevalencia
Mellanby y Coumoulos⁵⁷	5 años (n=1604)	Londres	10,6%
Koch y cols.⁶⁹	6-11 años (n=801)	Ladenburg (Alemania)	4% (17 niños y 13 niñas)
Koch y cols.⁷¹	6-12 años (n=1086)	Potenza (Italia)	6,3%
Bhat¹²²	9,3±1,9 años (n=1472)	Udaipur (India)	18%
Bircher¹¹⁹	3-10 años (n=433)	Rosario (Argentina)	4,16%
Mayta-Tovalino y Torres-Quevedo¹²⁰	n=185	Perú	6,49%
Gasparetto y cols.⁷²	6-12 años (n=263)	Porto Rico (Brasil)	14,8% (19 niños y 20 niñas)
Mahmoodian y Hashemi¹²¹	n=260	Teherán	5,8%
Paredes y Paredes¹¹⁸	4-11 años (n=1100)	Valencia	7,54%
Hassan y Qasim⁵⁸	5 años (n=569)	Baghdad	48,33%
Trevisan y cols.¹¹⁴	6-12 años (n=404)	Santa Terezinha de Itaipu (Brasil)	5,75% (67% niñas y 33% niños)
Heinrich-Weltzien y cols.²	11,7±1,1 años (n=1748)	Northern Mindanao (Filipinas)	16%
Tirth y cols.⁶⁷	12-15 años (n=780)	Moradabad (India)	20% (47,7% chicas y 52,5% chicos)
Bartsch⁸⁹	2-10 años (n=7624)	Rhein-Kreis Neuss (Alemania)	1,5%
Lloret y cols.¹¹⁷	9-12 años (n=575)	Valencia	2,4%
García y cols.¹¹⁶	6 años (n=3272)	Oviedo	3,1%
Chen y cols.¹²³	4 a 5 años aproximadamente (n=1397)	Shanghai (China)	9,9% (73 niños y 65 niñas)
Guzmán y cols.¹¹⁵	6-12 años (n=267)	San Juan de la Costa (Chile)	11,6% (48,4% niños y 51,6% niñas)

Tabla 5. Prevalencia de la tinción cromógena de origen bacteriano.

2.6.6. INFLUENCIA DE OTROS FACTORES

2.6.6.1. *HIERRO*

Los análisis del agua de bebida en zonas con una alta prevalencia de tinciones negras revelan que la distribución de iones de hierro se encuentra alrededor de 1,2 mg/L, lo cual excede el límite permitido en la India (0,3 mg/L según la Indian Standard Drinking Water-Specification), pudiendo ser el causante de la aparición de la pigmentación. Las bacterias del entorno periodontal producen sulfuro de hidrógeno que interactuaría con la abundancia de hierro existente en la saliva y el fluido gingival, y provocarían por este mecanismo la manifestación de estos depósitos⁶⁷.

En otra región de la India hallan algunos autores también hierro en exceso en el agua de bebida, confirmando la correlación positiva entre la presencia de este metal y el posible papel etiológico en la manifestación de estos pigmentos. En aquellas áreas donde los niveles de hierro son iguales o inferiores a 1 mg, hay un porcentaje mayor de gente sin ellos¹²⁴.

De acuerdo con estos estudios, a partir de una muestra de 3272 niños, de un 3,1% de ellos portadores de las pigmentaciones, se encuentra una asociación relevante entre niños que consumen suplementos de hierro y la presencia de estas manchas a nivel oral (11% del total de niños con manchas). Asimismo, también es importante la correlación entre niños con esta discromía cuyas madres habían ingerido estos suplementos durante el embarazo. Existe una conexión destacable igualmente entre la ingesta de alimentos con un alto contenido en hierro o de bebidas que contienen vitamina C y este fenómeno¹¹⁶.

La toma habitual de determinados víveres como huevos, legumbres, vegetales, etc., con un alto contenido en hierro, podría favorecer el crecimiento y colonización de las bacterias en la cavidad oral implicadas en este proceso. En la misma línea, Mayta-Tovalino y Torres-Quevedo¹²⁰ afirman esta conexión positiva entre suplementos dietéticos a base de hierro y la presentación de estas tinciones ($p=0,027$).

Por el contrario otros autores no perciben la asociación entre sulfato de hierro en la infancia y el consumo de alimentos que contienen hierro con la aparición de esta línea mesentérica^{66,68}.

En experimentos realizados en laboratorio con ratas a las cuales se les suministra azúcar de caña con hierro, los animales desarrollan mayor cantidad de placa¹²⁵. Específicamente, si es administrado sulfuro de hierro, la placa se torna de un color amarillo-marrón con una película brillante cubriendo la superficie dentaria. En cambio, en otros grupos donde se administra glicerofosfato férrico, la tonalidad adoptada es gris opaco. Al mismo tiempo, se advierte que la incidencia de caries es menor, sobre todo en el grupo de sulfuro de hierro.

2.6.6.2. RAZA

En un estudio con un total de 404 sujetos, 23 exhiben la coloración. En concreto, 14 pertenecen a la raza blanca (60,9%), dos, a la raza negra (8,7%), seis, a la raza malaya o parda (26,1%) y una, a la raza amarilla o mongoloide (4,3%)¹¹⁴.

2.6.6.3. COLUTORIOS

No se demuestra la relación entre el uso de colutorios y la manifestación de la tinción⁷².

2.6.6.4. AGUA DE CONSUMO

Según algunos autores, la posibilidad de aparición de las manchas extrínsecas negras es mayor cuando se consume agua del grifo comparado con el consumo de agua embotellada, proveniente de fuentes naturales, u otros orígenes. Respecto al número de lesiones cariosas, se constata que los niños que beben de fuentes naturales tienen más caries que aquellos que lo hacen en botella¹²⁶.

Una conclusión contraria es obtenida por López⁶⁸, donde afirma que no hay asociación objetiva. Aunque hay exceso de hierro en el agua consumida proveniente de fuentes naturales, no se observa asociación positiva en Caaparinga (Brasil). Los niveles de hierro hallados son de 0,01 a 2,45 mg/L y el límite establecido es de 0,30 mg/L.

De 261 sujetos de una muestra analizada de agua de consumo pública, solo en 20 (5,78%) es evidente la presentación de manchas extrínsecas negras. Además, las edades de estos sujetos afectados están comprendidas entre los 4 y 13 años de edad¹²⁷.

2.6.6.5. NIVEL SOCIOECONÓMICO

Cuando los ingresos familiares son bajos en el momento del alumbramiento o las madres tienen un bajo nivel de estudios, aumenta la prevalencia de niños con pigmentaciones negras. El origen de ello estaría en el fácil acceso que tienen las familias de clase alta a los servicios dentales y, con ello, a la prevención, y a los mejores hábitos de higiene y de alimentación que presentan¹²⁶. Estos resultados son coincidentes con López⁶⁸, donde la renta baja se relaciona con una prevalencia de manchas negras del 5,01%.

2.6.6.6. EDAD

Es mayor el número de niños con manchas negras en niños entre 6 a 8 años, y el fenómeno decrece con la edad¹¹⁸, si bien, para Bartsch⁸⁹ no hay disparidad entre grupos de 2 a 6 años (1,4%) y grupos de 6-10 años (1,5%). No se han realizado estudios similares en individuos de edad adulta.

Un factor que parece influir en el cambio en la composición de la microbiota oral a nivel subgingival es la pubertad¹²⁸. El número de bacterias pigmentadoras de negro es mayor en aquellas mujeres que se encuentran cerca de la menarquia, equiparado con aquellas que la han experimentado de forma reciente o las que la tuvieron en un período no superior a un año. *A. actinomycetemcomitans* presenta similares tasas de detección en los tres grupos de sujetos, sugiriendo la completa colonización del fluido crevicular de los niños por este microorganismo antes de entrar en la pubertad.

En otro trabajo no se halla asociación positiva entre la edad (sujetos 6-12 años) y la presencia de estas manchas⁷¹.

2.6.6.7. ÍNDICE DE PLACA Y HÁBITOS DE HIGIENE ORAL

Según el índice de placa simplificado, no se muestran resultados significativos entre pacientes con discoloraciones o sin ellas^{63,117,120}. Los acúmulos de placa están en gran parte de las superficies dentarias, reflejo de la mala higiene oral, aunque ello no es significativo comparado con el grupo control⁶⁴.

Bircher¹¹⁹ encuentra también que ambos grupos estudiados en su investigación (grupo 1, n=18, niños entre 3-10 años con manchas extrínsecas negras y grupo 2, n=18, control) tienen una correcta higiene bucal y las encías se muestran sanas, sin signo de inflamación.

En contraposición, se vincula la baja frecuencia de higiene bucal con estas manchas. Si el cepillado no se realiza de forma regular, aumentan las posibilidades que estas manchas aparezcan y que se vuelvan más consistentes, con lo cual después es más difícil eliminarlas^{68,116}. Una adecuada instrucción y motivación en higiene oral evita y/o disminuye la recidiva de las tinciones extrínsecas negras^{9,65}.

La frecuencia de cepillado no está asociada con la presencia de las tinciones y es más relevante en la formación de las mismas la eficiencia en la remoción de la placa dentaria¹¹³.

2.6.6.8. ALIMENTACIÓN EN LACTANTES

De acuerdo a un estudio publicado en 2013, el tipo de alimentación (pecho, leche en polvo, mixto) no influye en modo alguno¹¹⁶.

2.6.6.9. PESO AL NACER

En un estudio realizado en Oviedo entre enero (1988) y marzo (2011), en 3272 niños de 6 años de edad, el 10% de los niños con pigmentaciones exógenas son niños prematuros, siendo este resultado estadísticamente significativo ($p=0,05$), tanto en niños nativos como inmigrantes¹¹⁶.

2.6.6.10. SEXO

Diversos autores afirman que no hay relación entre el sexo y la existencia de tinciones extrínsecas negras^{115,117,118,120,123,129}. El porcentaje de niños respecto a las niñas no es significativo⁷¹.

2.6.6.11. CONSUMO DE ALIMENTOS Y/O BEBIDAS

Los hábitos nutricionales tradicionales en áreas donde el acceso a los alimentos es limitado parecen ser trascendentes en la experiencia de caries en individuos².

El picoteo de alimentos, debido a la acidificación del pH, alteraría la capacidad tampón de la saliva, reduciendo la presencia de la tinción y de su posterior calcificación⁹.

Según Huamán⁶³, es recomendable evitar el consumo de líquidos con colorantes, medicamentos con hierro, té o café, porque favorece la aparición de la pigmentación negra extrínseca de origen bacteriano. La ingesta de comida con salsa de soja hace que la misma pigmentación sea más abundante¹²³.

El mecanismo por el cual los pigmentos de estos alimentos se incorporan a la placa bacteriana y/o, posteriormente, al sarro o tártaro, es debido al proceso natural de mineralización de la placa bacteriana con el paso del tiempo. Estos pigmentos, junto con las altas concentraciones salivares de calcio y fósforo, forman precipitados que se agregan a la matriz intermicrobiana adherida a la superficie adamantina.

2.6.6.12. TRANSMISIÓN INTRAFAMILIAR BACTERIANA

Cuando la colonización bacteriana se produce de forma temprana en la cavidad oral, se mantiene durante toda la infancia de forma estable hasta la adolescencia. El estado periodontal en gestantes comparado con el de los recién nacidos indica claramente el patrón de colonización bacteriana¹¹. Por ello es de suponer que la transmisión de bacterias pigmentadoras de negro entre individuos de una misma familia sea más que evidente.

Durante la pubertad, el número de bacterias puede aumentar debido al influjo de las hormonas sexuales. Es posible la transmisión bacteriana entre individuos de la misma familia y de padres a hijos^{9,89}. De hecho es más probable que los niños cuyos padres tienen enfermedad periodontal adquieran bacterias periodontopatógenas tales como *P. gingivalis*, *T. denticola* y *B. forsythus*¹⁰.

2.6.6.13. TIPO DE DENTICIÓN

En la evaluación entre dentición decidua y permanente no se encuentran diferencias significativas¹¹⁹. La extensión de la pigmentación es distinta en dientes deciduos respecto de los permanentes, localizándose en los primeros una zona más oscura en gingival que va gradualmente haciéndose más clara hacia incisal/oclusal. En los segundos, la coloración más oscura está en la unión del tercio medio e incisal o en la unión del tercio gingival y medio.

2.6.6.14. TIPO DE DIENTE

Los dientes más afectados son el segundo molar deciduo en primer lugar y los incisivos centrales superiores. En el primer caso, empero, solo se halla en la mayoría de los casos una delgada línea pigmentada en el tercio cervical, quizá por la cercanía a la región rinofaríngea que facilitaría la aproximación de las bacterias gracias al moco infectado, mientras que en el segundo caso se podría interpretar que la adhesión y colonización bacteriana se ve beneficiada por la ausencia de saliva en estas piezas en respiradores bucales¹¹⁹.

Según la clasificación de las tinciones de Gasparetto, otros autores hallan 12 tinciones en 267 niños de grado 1 (38,7%), 11 de grado 2 (35,5%) y 8 de grado 3 (25,8%). Las áreas con más pigmentaciones son las caras palatinas de incisivos centrales superiores e inferiores, la cara palatina de premolares superiores y la vestibular de molares superiores¹¹⁵. Para García⁸³ son los primeros molares permanentes los más afectados.

2.6.6.15. INMIGRACIÓN

Hay una relación tangible entre inmigración y la manifestación de este fenómeno en Alemania, mostrando 41 niños (59,4%) hijos de inmigrantes, la mayoría de origen turco, estas manchas. Es interesante, por ello, pensar que haya una relación con aspectos culturales tales como costumbres alimenticias o una posible predisposición genética⁸⁹.

Aunque con un porcentaje algo mayor de manchas extrínsecas en sujetos nativos de 6 años de edad (n=3058) del 3,1% frente al 1,9% (n=214) en sujetos no nativos, no se hallan diferencias estadísticamente significativas. Estos autores creen que los resultados pueden ser consecuencia, no solo de la edad estudiada y del origen racial, sino también del tamaño grupal¹¹⁶.

2.6.6.16. OTROS FACTORES ANALIZADOS

Las patologías más comunes que provocan hiposialia y pueden contribuir a la aparición de la línea mesentérica o pigmentación extrínseca negra de origen bacteriano son: litiasis en las glándulas salivares, infecciones en las mismas, ciertos medicamentos (antihistamínicos, antihipertensivos...) y la radioterapia de cabeza y cuello, con la consiguiente xerostomía⁹.

Por lo que respecta a la respiración bucal, la propagación de la mancha por la superficie dentaria es mucho mayor (95%) en aquellos niños que tienen este patrón¹²⁰. También aquellos que presentan un patrón de respiración bucal permanente (durante el día y la noche) tienen mayor porcentaje de superficie manchada que aquellos que solo lo hacen durante la noche.

Considerando la onicofagia, no existe correlación positiva entre pacientes con y sin este hábito y la presencia de esta tinción. En cambio, con la digitosucción, de un 61% de niños con este hábito, más del 20% de las superficies dentales estudiadas muestran esta pigmentación¹²⁰.

2.6.7. MANCHAS DENTARIAS NEGRAS Y CARIES DENTAL

Bartsch⁸⁹ sugiere que la presencia de estas manchas dentarias exógenas ejerce un efecto protector contra la caries dental^{70,123}. Así se demuestra en su estudio donde los resultados revelan una cantidad superior de *A. naeslundii* y menor adhesión de *S. mutans*. El recuento de *A. naeslundii* es superior en niños libres de caries con manchas negras y en los que presentan lesiones cariosas hay mayores cantidades de *P. gingivalis* y de *A. actinomycetemcomitans*⁸¹.

La mayor prevalencia de *Streptococcus mutans*, junto con un elevado índice de placa bacteriana, no parece influir en la presencia de lesiones de caries activas⁶⁴. La presencia de una elevada respuesta de anticuerpos *Actinomyces* simula de este modo aumentar la protección frente a la caries directamente en asociación con el agua de bebida fluorada, independientemente de la eficacia en la higiene oral¹³⁰.

De acuerdo con estos resultados, un 56,5% de niños entre 6 a 12 años con manchas extrínsecas negras, no exhiben lesiones de caries en la dentición permanente. Teniendo en cuenta solo la dentición decidua, este porcentaje disminuye al 19%¹¹⁴.

La severidad de la enfermedad por caries es menor en los individuos portadores de la pigmentación y, sobre todo, en los que tienen mayor afectación de superficies dentales por estos depósitos^{60,72,116,120,126,131}. Se confirma, además, el efecto protector de las tinciones en una muestra de 110 adultos portadores de las mismas con edades comprendidas entre los 18 a 29 años de edad¹²⁹.

En un relato de un caso, el sujeto es portador también de esta discoloración, pero no muestra lesiones de caries dental, la higiene bucal es satisfactoria y la mucosa gingival es normal, sin inflamación⁶⁶.

La hipótesis sugerida por la cual estos individuos presentan menos caries es la creación de un entorno desfavorable para las bacterias implicadas en el desarrollo de la caries por medio de la competencia ejercida por las bacterias implicadas en el desarrollo de la tinción, lo que motivaría dificultades en la adhesión de las primeras a las superficies dentales o cambiaría la ecología del *biofilm*¹²⁶.

Los motivos que se podrían citar son la baja patogenicidad de las bacterias causantes de esta entidad y el desarrollo de la misma en un entorno pobre en azúcares⁷¹. El autor también supone que muchos niños con caries de biberón poseen estas manchas, suponiendo ello una confusión en muchos casos cuando la caries es diagnosticada.

Los bajos niveles de caries se pueden atribuir a los programas de intervención a los cuales los individuos están expuestos².

Bhat¹²² afirma que no existe una asociación clara entre estas tinciones en las superficies lisas de los dientes y menos lesiones cariosas en las mismas, se trata más de un efecto de baja actividad cariogena en general que de una acción localizada. Aparte, es posible afirmar que hay menor incidencia de caries en escolares con mayores áreas de superficie dental cubierta por estos pigmentos. Tampoco es posible afirmar que hay una correlación significativa¹¹³.

Otros autores obtienen una conclusión totalmente diferente de sus investigaciones. En un relato de un caso clínico de una paciente de 5 años de edad, se advierte una actividad de caries elevada junto con la presencia de tinciones negras⁶⁵. Para López⁶⁸, este fenómeno no representa un factor protector frente a la caries dentaria. Los niños tienen mayor prevalencia de caries, aunque sin ser estadísticamente significativo¹¹⁷. Tampoco estaría relacionado con la severidad de las lesiones cariosas.

La relación de los artículos citados en este apartado, a modo de resumen, se puede apreciar en las siguientes tablas (tabla 6a y 6b).

AUTORES	RELACIÓN ENTRE MANCHAS EXTRÍNSECAS NEGRAS Y PRESENCIA DE CARIES DENTAL	HALLAZGOS MICROBIOLÓGICOS
Shourie ⁷⁰	Efecto protector	Datos no disponibles
Mellanby y cols. ⁶⁰	Mayor número de individuos libres de caries	Datos no disponibles
Koch y cols. ⁷¹	Efecto protector: el número de sujetos libres de caries es estadísticamente significativo comparado con el grupo control	Datos no disponibles
Gasparetto y cols. ⁷²	Mayor número de individuos libres de caries	Datos no disponibles
Levine y cols. ¹³⁰	Efecto protector en relación con número de anticuerpos de <i>Actinomyces</i> elevado, ingesta de flúor e higiene	Aumento en los niveles de anticuerpos de <i>A. naeslundii</i>
Mayta-Tovalino y Torres-Quevedo ¹²⁰	Efecto protector	Datos no disponibles
Trevisan y cols. ¹¹⁴	Mayor número de individuos libres de caries sobre todo en la dentición permanente	Datos no disponibles
Heinrich-Weltzien y cols. ²	Efecto protector: la prevalencia de caries es significativamente menor en individuos con manchas	Datos no disponibles
Bartsch ⁸⁹	Efecto protector: con el índice CAO-D las diferencias son significativas en comparación con el grupo control	Mayor número de <i>A. naeslundii</i> y menor adhesión de <i>S. mutans</i> en portadores de manchas
França-Pinto y cols. ¹²⁶	Mayor número de individuos libres de caries	Datos no disponibles
Boka y cols. ¹³¹	Efecto protector: datos estadísticamente significativos	Datos no disponibles
Loureiro y cols. ⁶⁶	No se observan caries	Datos no disponibles
García y cols. ¹¹⁶	Menor índice CAO-D en portadores de tinciones	Datos no disponibles
Heinrich-Weltzien y cols. ⁸¹	Efecto protector en dentición temporal	Recuento mayor de <i>A. naeslundii</i> y menor de <i>Lactobacillus</i> spp. y de <i>S. mutans</i>
Chen y cols. ¹²³	Efecto protector	Datos no disponibles
Shmuly y cols. ¹²⁹	Efecto protector en dentición definitiva: datos estadísticamente significativos	Datos no disponibles

Tabla 6a. Relación entre caries y presencia de tinciones extrínsecas negras de origen bacteriano. Efecto protector.

AUTORES	RELACIÓN ENTRE MANCHAS EXTRÍNSECAS NEGRAS Y PRESENCIA DE CARIES DENTAL	HALLAZGOS MICROBIOLÓGICOS
Bircher¹¹⁹	Efecto no protector: relación directa entre manchas y caries	Mayor número de <i>P. melaninogenica</i>
Reis y cols.⁶⁴	Autores no señalan una respuesta concluyente: los odontólogos deben prestar atención para diferenciar estas manchas con lesiones de caries activas	En relación con el grupo control, el número de <i>S. mutans</i> es estadísticamente significativo en el grupo con tinciones
Paredes y Paredes¹¹⁸	Efecto no protector: no hay asociación clara entre caries y manchas dentarias negras	Datos no disponibles
de Souza y cols.⁶⁵	Efecto no protector: hay mayor número de caries en individuos portadores de manchas	Datos no disponibles
Bhat¹²²	Efecto no protector: datos estadísticamente significativos	Datos no disponibles
López⁶⁸	No existe un efecto protector: resultados no significativos	Datos no disponibles
Lloret y cols.¹¹⁷	El número de caries es mayor, pero no es estadísticamente significativo	Datos no disponibles
Akyüz y cols.¹¹³	Es menor el índice CAO-D en niños con pigmentaciones, pero no es significativo	Datos no disponibles

Tabla 6b. Relación entre caries y presencia de tinciones extrínsecas negras de origen bacteriano. Efecto no protector.

2.6.8. TRATAMIENTOS APLICADOS EN LA ACTUALIDAD

2.6.8.1. *REMOCIÓN MECÁNICA*

La remoción de los pigmentos es posible mediante el uso de piedra pómez o un spray de bicarbonato de sodio o pasta profiláctica, consiguiendo la eliminación completa¹³². Sin embargo, en un período menor a 10 meses, el problema tiende a reaparecer en la cavidad oral, posiblemente debido a la recolonización bacteriana⁶⁵.

La dificultad de remoción de estas tinciones viene determinada por la calcificación y adherencia que tienen al esmalte, muchas veces porque se considera que los individuos portadores contienen mayor presencia de calcio y fósforo en la saliva, de ahí que quizá se una la pigmentación al contenido inorgánico de la superficie del esmalte y sean muy resistentes a su eliminación completa.

Con el uso de ultrasonidos y una pasta profiláctica no muy abrasiva para completar el pulido, se pueden eliminar fácilmente los pigmentos⁹. De todas formas, este tratamiento realizado de manera repetitiva, puede conducir a una abrasión del esmalte.

Paredes y Paredes¹¹⁸ afirman que no se puede determinar la misma pauta para todos los pacientes, ya que la frecuencia de esta limpieza profesional va a depender del tiempo que tarda en reaparecer la tinción en cada individuo.

Cuando es necesario restituir la estética de los dientes (casos de lesiones de caries cavitadas e inactivas con depósito de pigmentos externos), el protocolo a seguir sería: aislamiento absoluto, profilaxis con piedra pómez y pasta profiláctica, microabrasión con una mezcla de piedra pómez y ácido ortofosfórico al 37% en tres ciclos de 15 segundos cada uno, con remoción entre ellos de la mixtura, restauración con resina fotopolimerizable, pulido y aplicación tópica de flúor¹³².

Según la Academia Americana de Odontología Pediátrica, el uso de pastas de diente abrasivas y productos de blanqueamiento, así como la microabrasión durante una profilaxis, podría conllevar la pérdida de la película adquirida¹³³.

Las manchas desaparecen cuando el paciente completa la etapa de recambio dentario, no observándose este fenómeno en la dentición definitiva⁶⁶.

2.6.8.2. REMOCIÓN MANUAL CON CURETAS

A causa de la remoción de la capa más superficial del esmalte cuando se persigue la eliminación de los pigmentos exógenos negros con curetas de forma manual, este procedimiento debe ser llevado a cabo con precaución, ya que se hallan depósitos de calcio y fósforo procedentes de la estructura dental, junto con iones metálicos si las curetas empleadas son metálicas, o bien con trazas de grafito si estos instrumentos no contienen metal⁹⁸.

2.7. TRATAMIENTO ALTERNATIVO: TERAPIA FOTODINÁMICA

2.7.1. CONCEPTOS BÁSICOS

2.7.1.1. ESPECTRO DE LUZ VISIBLE

La luz está constituida por pequeñas partículas que transportan energía, los fotones, que también son ondas electromagnéticas y, por tanto, tienen longitud de onda¹³⁴. Los seres humanos solo somos capaces de percibir un determinado rango de fotones, cuya longitud de onda se encuentra entre 400 a 800 nanómetros, lo que consideraríamos la luz o espectro visible¹³⁵. Las ondas más cortas establecen el color azul o violeta (aproximadamente 380 nanómetros), las medias el color verde y las largas, el color rojo (alrededor de 700 nanómetros). La radiación ultravioleta se encuentra por debajo de 400 nanómetros y la infrarroja por encima de 700 nanómetros (fig. 9).

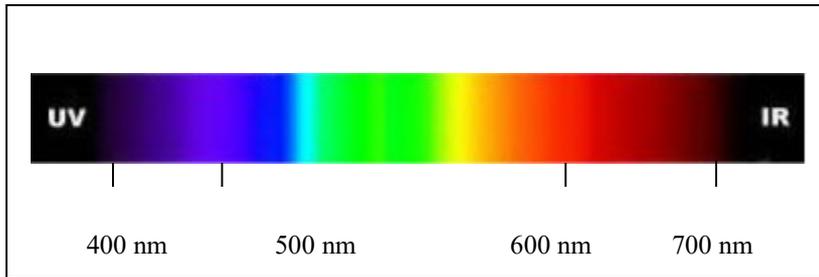


Fig .9. Espectro de luz visible (fuente: autor).

La luz monocromática se describe como aquella que está formada por una sola frecuencia, mientras que la policromática contiene más de una. La radiación que contendría todas las frecuencias del espectro visible sería la denominada luz blanca¹³⁴.

2.7.2. MEDICIÓN DE ENERGÍA DE LAS ONDAS ELECTROMAGNÉTICAS

La irradiancia se trata del valor promedio de la energía por unidad de área y de tiempo que recibe una superficie cuando se ilumina con un haz de luz. Esta magnitud, que se mide en laboratorio, se expresa en vatios por unidad de área (W/m^2). Aplicado al campo de la fotometría, se emplea otro término en lugar de la irradiancia, la intensidad. La intensidad luminosa es el concepto de la concentración de luz en una dirección específica, radiada por segundo. Las unidades utilizadas para su medición son los W/cm^2 ¹³⁴.

2.7.3. FUNDAMENTOS TERAPIA FOTODINÁMICA

La terapia fotodinámica se define como la inactivación de las células, microorganismos o moléculas inducido por la luz¹³.

El mecanismo de la terapia fotodinámica contempla el proceso por el cual un fotosensibilizador (sustancia fotoactivable) es captado por microorganismos y, después de la exposición a la luz a una adecuada longitud de onda, queda en estado excitado. Entonces, el fotosensibilizador transfiere energía desde la luz a la molécula de oxígeno para generar oxígeno singlete y radicales libres que son citotóxicos para las células.

El agente fotosensibilizador, positivamente cargado a pH fisiológico, como fenotiazinas (azul de metileno), porfirinas y ftalocianinas podría provocar directamente la fotoinactivación de bacterias gram-positivas y gram-negativas. Ello sería posible gracias a la disrupción de la pared externa bacteriana, que permitiría el paso de antibióticos u otras moléculas hidrofóbicas¹⁴.

Hay dos tipos de reacciones en la terapia fotodinámica. Posteriormente a la exposición a la luz, el fotosensibilizador activado (en el estado de triplete excitado) puede seguir dos caminos: en el primero están implicadas reacciones de transferencia de electrones desde el fotosensibilizador en estado triplete con la participación de un sustrato para producir iones radicales que reaccionarían con el oxígeno para dar lugar a especies citotóxicas, mientras que en el segundo estaría implicada la transferencia de energía desde el fotosensibilizador en estado triplete al estado base del oxígeno molecular (triplete) que produciría oxígeno singlete y que desencadenaría daños oxidativos y efectos letales en las moléculas biológicas, por el deterioro de las paredes y membranas celulares¹³⁶. Este oxígeno singlete tiene una vida muy corta en los sistemas biológicos (<0,4 milisegundos) y el radio de acción también es muy delimitado (0,02 μm), por ello es fundamental que esta técnica localice directamente el fotosensibilizador¹².

La primera vía, que involucra la translocación directa del fotosensibilizador a la membrana citoplasmática, sería operativa para las bacterias gram-positivas y protozoos en estado trofozoito. La segunda vía, donde es necesario un aumento de la permeabilidad de la pared externa, es obtenida por levaduras, protozoos en estado cístico y bacterias gram-negativas. Los derivados tetracatiónicos parecen ser los más activos frente a las cepas de bacterias gram-negativas¹⁴.

Dentro del tratamiento periodontal, la terapia fotodinámica es uno de los avances más recientemente introducidos. Las bacterias implicadas en esta patología y que, a su vez, están involucradas en la aparición de las manchas extrínsecas negras, son *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *P. nigrescens*, entre otras. Esta terapia podría, por tanto, tener las siguientes ventajas a nivel odontológico:

- Ausencia de efecto fototóxico para las células humanas.
- Posibles beneficios a nivel clínico, microbiológico e inmunológico con impacto mínimo en la microbiota.
- Aplicación rápida e indolora de la luz.
- Penetración de la luz en los tejidos y la placa y, con ello, eliminación de las bacterias presentes en las células epiteliales gingivales.
- Selectividad por los microorganismos patógenos.

De esta forma, el *biofilm* podría permanecer siempre en un estado “joven”, ya que solo estarían presentes colonizadores que aparecen tempranamente debido a las sucesivas iluminaciones que evitarían la propagación de *biofilms* fotosensibles¹⁶.

2.7.4. EFECTO FOTOTÓXICO EN MICROORGANISMOS

2.7.4.1. *SIN AGENTES FOTSENSIBILIZADORES EXTERNOS*

Los agentes fotosensibilizadores son sustancias que se usan en la terapia fotodinámica. Cuando las células a las cuales va dirigido el tratamiento lo absorben y se exponen a la luz, las sustancias se vuelven activas y destruyen a las mismas. Estos agentes pueden ser sustancias externas al organismo humano o internas, es decir, pueden ser componentes propios de la célula.

En experimentos realizados *in vitro*, la viabilidad bacteriana tras la exposición a la luz azul (longitud de onda, 408-750 nm) proveniente de fuentes de fotocurado, como la lámpara halógena (lámpara halógena tungsteno-cuarzo), la luz de emisión de diodos (LED) y el arco de plasma resulta en una supervivencia de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* mucho menor, y tiene correlación positiva con el tiempo de exposición.

Concretamente, la reducción en el número celular de *P. gingivalis* después de la exposición a la luz LED y al arco de plasma es significativamente mayor, en el segundo caso llegando hasta al 99,6% tras un minuto en contacto con la luz.

En el caso de *F. nucleatum*, la mortalidad es mayor con la lámpara de luz halógena y la de arco de plasma cuando las células se encuentran en medio agar y no en suspensión. Se podría atribuir este resultado a la expansión y absorción de la luz azul en la suspensión, reduciendo la profundidad de penetración¹³⁷.

La concentración mínima inhibitoria para el crecimiento bacteriano para las diferentes fuentes de luz empleadas está en el rango de 16-62 J/cm², sin diferencias significativas entre ellas. El menor tiempo de exposición indispensable (10 segundos) es para la lámpara de arco de plasma, a una distancia de 1 mm. Si la distancia se aumenta de 1 a 10 mm en el medio de agar, la concentración precisada es mayor. Sin embargo, son imprescindibles concentraciones siete a diez veces superiores para las bacterias gram-positivas *S. mutans* y *Streptococcus faecalis*, 152-212 J/cm², con un tiempo de exposición de 90-10 segundos con la lámpara de arco de plasma. El láser de diodos cercano a los infrarrojos, en condiciones similares de exposición, no produce efecto alguno en la viabilidad de las cuatro especies bacterianas¹³⁷.

En consonancia con este trabajo, hay una inhibición significativa en el crecimiento de *P. gingivalis* tras la exposición a la lámpara de luz azul (400-410 nm), mientras que no se percibe este suceso cuando las longitudes de onda son superiores a 500 nm. Por ello, es importante recalcar la selectividad en la actividad bactericida con luz azul monocromática visible entre 400-410 nm sin ayuda de fotosensibilizadores exógenos. Este espectro de longitud de onda, con una densidad de 15 J/cm² de constante energía aplicada *in vitro*, produce más del 75% de la inhibición del crecimiento comparado con el grupo control sobre distintas condiciones de irradiación (50 mW/cm² durante 300 segundos, 200 mW/cm² durante 75 segundos o 400 mW/cm² durante 38 segundos)¹⁵.

Bajo un influjo de energía de forma constante, cuanto mayor es el tiempo de exposición, es también superior el efecto inhibitorio y, al contrario, si se mantiene el tiempo de exposición y se aumenta el influjo de energía, la actividad bactericida igualmente es mayor (hasta aproximadamente 90% con 100 mW/cm²).

Es probable, en consecuencia, que esta cepa patogénica posea elevados niveles de porfirinas que podrían actuar como agentes fotosensibilizadores internos. La determinación de la supervivencia bacteriana revela que la actividad bactericida de la luz azul es causante en parte de la inhibición del crecimiento bacteriano.

Cuando se aplica luz azul desde una lámpara de luz halógena, es constatable la mortalidad inducida en las bacterias periodontopatógenas en estado planctónico. La tendencia decreciente en los recuentos de unidades formadoras de colonias está relacionada con el aumento en el tiempo de exposición. Casi todas las colonias son eliminadas con 60 segundos de exposición (*P. gingivalis* 100%, *F. nucleatum* 99,1%), excepto *A. actinomycetemcomitans*, que no exhibe diferencias significativas¹³⁸.

La teoría que intenta analizar la razón según la cual hay una disminución en el crecimiento de *P. gingivalis*, relaciona la mortalidad bacteriana inducida por la luz azul LED con la supresión de la expresión de los genes asociados con la replicación del ADN cromosómico y la división celular a nivel transcripcional¹³⁹. La diferencia entre ambos tipos de luz radica en la longitud de onda de ambas. En lo que respecta a la degradación del ARN, ésta es ínfima y no hay diferencias significativas en cuanto a la luz roja y azul de LED, por lo que se hipotetiza que la luz no es la causante de la mortalidad de *P. gingivalis*. Comparando la acción que provocan la luz roja y azul de LED en la proliferación bacteriana, la irradiación roja (135 J/cm²) durante 180 segundos no revela asociación positiva equiparado con el grupo control, efecto obtenido inversamente con la luz azul (135 J/cm²) durante 90 segundos de irradiación.

Se constata también la inhibición del crecimiento bacteriano *in vitro* tras la aplicación de luz por medio de una lámpara de luz de haluro metálico con un espectro entre 380 a 520 nm. La mortalidad de las cepas de *P. intermedia* ATCC 25611 y de *P. nigrescens* ATCC 33563 es total con 4,2 J/cm² (1 minuto de irradiación). La *P. melaninogenica* ATCC 25845 reduce su población en un 70% con 4,2 J/cm² y es completamente eliminada con una exposición de 21 J/cm² (5 minutos de irradiación).

Las fracciones de población superviviente de *P. gingivalis* ATCC 33277 después de una exposición de 4,2, 21 y 42 J/cm², son 77,25%, 12,55% y 1,48%, respectivamente. Específicamente, *P. melaninogenica* tiene más susceptibilidad, seguido de *P. nigrescens*, *P. intermedia* y *P. gingivalis*¹⁴⁰.

Por lo que respecta a la cantidad de porfirinas endógenas existentes en las bacterias, *P. intermedia* produce 120, 6,5 y 5,5 veces mayor cantidad que *P. gingivalis*, *P. melaninogenica* y *P. nigrescens*, respectivamente. Pese a ello, *P. intermedia* y *P. nigrescens* necesitan solo de un minuto de irradiación para ser eliminadas radicalmente. La razón de ello se debería a que *P. intermedia* requeriría una menor energía lumínica para este proceso que la *P. nigrescens* y que el contenido de porfirinas puede ser no solo el único determinante de la fotosensibilidad. El efecto fototóxico en las bacterias periodontopatógenas inducido por luz visible (400-500 nm) es oxígeno dependiente, resultando en la formación mayormente de radicales hidroxilo (mecanismo tipo I).

Cuando no hay enzimas que puedan neutralizar las especies reactivas de oxígeno, las bacterias son más sensibles al oxígeno que cuando son expuestas a la luz azul. Si *P. gingivalis* y *F. nucleatum* son expuestas a la luz azul de LED en situación de anaerobia se elimina el efecto fototóxico. La reducción en la viabilidad bacteriana es notable para *P. gingivalis* y *F. nucleatum* en aerobiosis¹⁴¹.

Si lo que se emplea es láser de argón a cultivos *in vitro* y sin la adición de un fotosensibilizador exógeno, se observa que las bacterias pigmentadoras de negro (*P. endodontalis* 35406, *P. gingivalis* 33277, *P. intermedia* 15033, *P. denticola* 33184, *P. nigrescens* 33563 y *P. melaninogenica* 25845) revelan el efecto fototóxico de la luz cuando son cultivadas con hemina. Entonces la protoporfirina celular no sería un factor crucial en la toxicidad¹⁴².

La susceptibilidad del *biofilm* de estas bacterias pigmentadoras de negro depende del origen de hierro inorgánico y del organismo en cuestión.

Con diferentes medios de cultivo agar (con hemina o sangre de oveja), las bacterias responden de forma distinta a la irradiación, lo que sería atribuible al distinto metabolismo y/o asimilación de las porfirinas. Tras 3 días de incubación en laboratorio, tiempo preciso en el cultivo celular para poder cuantificar la protoporfirina, no se observa asociación positiva entre la cantidad de ésta presente en las células viejas equiparado con la sensibilidad de los *biofilms* más jóvenes.

Otro factor que influye en la fotosensibilidad es la madurez del *biofilm*. Exceptuando *P. gingivalis* cuando es inoculada en medio con sangre, normalmente es menor el efecto de la irradiación del láser en el crecimiento del *biofilm* cuando éste es más maduro¹⁴². La temperatura alcanzada durante la irradiación no es un elemento decisivo en la inhibición del crecimiento, ya que con energía de irradiación de 36, 70 y 80 J cm⁻², ésta no alcanza valores superiores a 2°C.

Específicamente, la dosis mínima de irradiación precisa en *P. gingivalis* y *P. intermedia* para provocar la detención de la proliferación es de 50/J cm⁻² en los dos medios de agar. Para *P. endodontalis* y *P. denticola*, cuando son cultivados en medio enriquecido con hemina, requieren de menor dosis (50 y 75%, respectivamente), que cuando son inoculados en medio con hemoglobina¹⁴².

Los experimentos *in vivo* también muestran disminución de la carga bacteriana al aplicar las distintas fuentes de luz. Usando un dispositivo de 3 luces de emisión de diodos (LED) con un colimador óptico y aplicado intraoralmente en las caras bucales de premolares y molares maxilares y mandibulares durante 4 minutos diariamente por un total de cuatro días (energía liberada por la luz: 8,4 J/cm²), se perciben importantes diferencias en los niveles de bacterias pigmentadoras de negro, especialmente *P. gingivalis* y *P. intermedia*¹⁶.

Considerando el efecto fototóxico global en los microorganismos de la placa dental (muestras *in vivo*), las fracciones supervivientes tras someter las muestras a la luz con intensidades de 4,2 y 21 J/cm², son aminoradas en un 17 y 25%, proporcionalmente. El crecimiento de las cuatro bacterias pigmentadoras de negro se reduce de 2 a 2,8 veces¹⁴⁰.

Además de estos microorganismos, hay asimismo una merma substancial en la población bacteriana de *Streptococcus intermedius*, *F. nucleatum* ss. *vincentii*, *F. nucleatum* ss. *polymorphum*, *Fusobacterium periodonticum* y *Capnocytophaga sputigena*, aunque no significativa, en el lado expuesto. El número de los dos primeros mengua en ambos lados, el tercero y el cuarto proliferan en las superficies no expuestas y el último experimenta inhibición, pero no reducción, en el lado expuesto y crecimiento en el lado contrario.

Aparte de la disminución en el recuento de bacterias gram-negativas (y aumento de las bacterias gram-positivas si el experimento es realizado *in vivo*) tras la exposición a la luz de xenón, Sterer y Feuerstein¹⁴³ añaden que hay también una merma en la cuantía de compuestos sulfúricos volátiles, causantes de la halitosis. Como las bacterias gram-negativas son consideradas las responsables de la mayor producción de estos compuestos, con la mengua en su población, del mismo modo hay reducción de los otros parámetros. La bajada de pH está correlacionada con la exposición a la luz, tras 30 segundos, el pH es de 6, con 60 segundos, el pH es de 5,5 y tras 120 y 240 segundos, el pH es de 5.

2.7.4.2. *CON AGENTES FOTOSENSIBILIZADORES EXTERNOS*

En la terapia fotodinámica también se usan sustancias químicas (agentes fotosensibilizadores) externos que interactúan con el microorganismo y, al aplicarles seguidamente la fuente de luz, provocan su muerte.

La reducción en las unidades formadoras de colonias de diferentes microorganismos tras la exposición a distintas unidades de luz en presencia del fotosensibilizador azul de metileno resulta en una disminución de la viabilidad dosis-dependiente^{144,145}.

La combinación que provoca mayor mortalidad (95-99%) es la del láser de diodos-655 a 100 mW durante 60 segundos (densidad de energía 21,2 J/cm²) con azul de metileno. Se descarta la posibilidad que esta efectividad sea debida al aumento de temperatura producido por el láser en el azul de metileno, puesto que la diferencia es de solo 0,5-3,9°C en todos los grupos de láser (helio-neón, de diodos a 665 nm y a 830 nm) con o sin este agente fotosensibilizador. Por ello, el azul de metileno no desencadenaría la muerte celular por la conversión de la energía del láser en calor.

Considerando el tema de la presente tesis, en un estudio reciente sobre la terapia fotodinámica en pigmentaciones extrínsecas negras, se consigue la completa supresión de la tinción tras el empleo de un láser de diodos aluminio-galio-indio-fósforo a 660 nm y el uso de azul de toluidina como agente fotosensibilizador. La potencia incidente fue de 70 J/cm² y el láser se aplicó en las caras vestibulares y linguales en dirección apico-coronal durante 23 segundos, tras lo cual las manchas negras fueron eliminadas con curetas Gracey y el agente con pasta profiláctica y taza de goma. Este protocolo se repitió 5 semanas consecutivas (1 vez/semana) de acuerdo al área de irradiación (1: dientes anteriores mandibulares; 2: dientes mandibulares posteriores; 3: dientes anteriores maxilar superior; 4: dientes posteriores maxilar superior; 5: todas las superficies dentales). Tras 7 meses de seguimiento, se comprobó la efectividad completa del tratamiento. Además, hubo una reducción en el índice gingival (de 46,52% a 13,58%) y una ligera mejoría en el índice de placa, aunque no significativa⁸⁰.

A nivel del tratamiento periodontal, comparando dos grupos a los cuales se les practica tratamiento con ultrasonido y, además, en uno de ellos, se añade la terapia fotodinámica mediante la aplicación de un láser de diodos en las bolsas periodontales y cloruro de fenazationio como agente, no se hallan diferencias significativas entre ambos en cuanto a profundidad de sondaje, nivel de inserción, sangrado al sondaje y recuento global bacteriano entre el primer y 90 días después del comienzo del tratamiento. La única bacteria que exhibe una reducción importante es *P. gingivalis* en los dos grupos¹⁴⁶.

En otra investigación, 3 a 6 meses después de un tratamiento periodontal con y sin ayuda de la terapia fotodinámica usando cloruro de fenazationio como agente fotosensibilizador, no hay diferencias significativas en el nivel de inserción clínico y la profundidad de sondaje. Sin embargo, sí que se experimenta mejoría en los niveles promedio de población microbiana, en el índice de placa y en el índice de sangrado global¹⁴⁷.

Tras la administración subgingival de cloruro de toluidina y luz láser combinado con el raspado y alisado radicular en pacientes con moderada a severa periodontitis también se disminuye el nivel de sangrado de las bolsas periodontales a los 3 meses del tratamiento y los niveles de *P. gingivalis*¹⁴⁸.

Al realizar el tratamiento periodontal en 15 pacientes a los cuales se les realiza una terapia distinta en cada cuadrante, se demuestra que la terapia fotodinámica como coadyuvante del raspado y alisado radicular tiene acción antibacteriana en las bacterias periodontopatógenas *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *P. intermedia*. Estos resultados, sin embargo, son todavía mejores si se le aplica un colorante como azul de toluidina y, aún más, se magnifican tras diversas aplicaciones de la luz LED¹⁴⁹.

También en la fase de mantenimiento periodontal, en aquellas bolsas persistentes a las cuales se les aplica esta terapia comparando con un grupo control sin la misma, se rechaza la hipótesis de que la terapia fotodinámica es superior al tratamiento periodontal mecánico, posiblemente en parte debido al difícil acceso a estas localizaciones de las fuentes de luz para llevar a cabo este procedimiento.

El recuento en la población microbiana está reducido en torno al 30-40% en ambos grupos inmediatamente después del tratamiento, pero se adquieren los niveles iniciales de nuevo a los 3 meses. Tampoco el índice de placa, la profundidad de sondaje promedio (grupo control: de 3,3 a 3,1 mm y grupo terapia fotodinámica: 3,5 a 3,3 mm) y el sangrado al sondaje muestran diferencias significativas a los 3 meses respecto a los valores iniciales. Se advierte, no obstante, que las bolsas de categoría 5-5,9 mm recuperan 0,4 mm de nivel de inserción con la terapia fotodinámica¹⁵⁰.

Concretamente, el efecto letal de la utilización de un láser de helio/neón junto con el colorante azul de toluidina, demuestra que es mayor para *P. gingivalis* cuando las células se encuentran en fase *lag* (cuando un microorganismo recién cultivado se adapta a las nuevas condiciones de su entorno y su metabolismo se pone en marcha para poder crecer activamente) que cuando se hallan en fase estacionaria¹⁵¹.

La hipótesis para ello sería que, en el primer caso, la energía se emplearía sobre todo para la división en lugar de para la producción de proteínas y otras moléculas que se incorporan posteriormente a la superficie celular (lo cual es más normal que se observe en la fase estacionaria) y, con ello, habría una mayor recepción de fotosensibilizador. Aparte de eso, en las células que contienen mayor cantidad de material asociado en su superficie, el azul de toluidina se observa a una mayor distancia de la membrana citoplasmática y no puede, por tanto, alcanzar el lugar de acción donde es más efectivo.

En otro estudio realizado en ratas, sin embargo, se indica que, cuando el agente fotosensibilizador azul de toluidina es empleado junto con luz roja de un láser de diodos en lugar de luz azul (diferente longitud de onda), es mayor la mortalidad de *P. gingivalis*. El uso de 1 mg de azul de toluidina por mililitro en combinación con distintas intensidades de luz, resulta en un recuento bacteriano menor a 10 unidades formadoras de colonia, siendo mayor este efecto en palatino que en vestibular, probablemente a causa de la mayor dosis de energía recibida en la región palatina por la cercanía a la fuente de luz. La difusión de la luz roja decrece logarítmicamente cada 3 mm en intensidad, así que las regiones vestibulares recibirían menor dosis lumínica¹⁵².

Si se tiene en cuenta el mismo colorante aplicado en 5 adolescentes entre 14 a 16 años en el tercio medio y los dos tercios posteriores de la lengua para el tratamiento de la halitosis, una hora después del uso de la terapia fotodinámica, se comprueba la eficacia de la misma. Estos autores observan que la concentración de compuestos sulfúricos volátiles se reduce¹⁵³.

Respecto al efecto de la terapia fotodinámica en otros microorganismos no periodontopatógenos, se observa que provoca severos daños celulares, incluso lisis celular, sobre *E. faecalis*, cuando se combina el uso de una lámpara LED y los colorantes azul de metileno y azul de toluidina¹⁵⁴. Tras la aplicación de una lámpara de haluro metálico junto con los agentes fotosensibilizadores azul de metileno, rosa de Bengala y curcumina, se consigue la mortalidad en laboratorio de las bacterias *S. sanguis*, *S. mutans* y el hongo *C. albicans*, aunque en este último caso, la curcumina no es efectiva¹⁵⁵. Con otros compuestos porfirínicos como agentes fotosensibilizadores, se causa la muerte celular de *S. aureus* y *E. coli*¹⁵⁶. En la tabla 7 se muestra un resumen de los principales artículos relacionados con la terapia fotodinámica en odontología, con y sin el uso de agentes fotosensibilizadores.

Autores	Tipo de lámpara	Tipo de estudio	Agente fotosensitizador	Longitud de onda	Potencia media	Tiempo de aplicación	Bacterias afectadas por la terapia
Henry y cols. ¹⁴²	Láser de argón	<i>In vitro</i>	No usan	488-514 nm	0,58 W	Datos no disponibles	<i>P. endodontalis</i> <i>P. denticola</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. melaninogenica</i> <i>P. intermedia</i> <i>P. nigrescens</i>
Bhatti y cols. ¹⁵¹	Láser helio/neón	<i>In vitro</i>	Azul de toluidina O	632,8 nm	7,3 mW	60 seg	<i>P. gingivalis</i>
Yilmaz y cols. ¹⁵⁷	LED	<i>In vivo</i>	Azul de metileno	685 nm	30 mW	71 seg	Datos no disponibles
Kömerik y cols. ¹⁵²	LED (Diamed®)	<i>In vivo</i>	Azul de toluidina	630 nm	0,1 W	8 min	<i>P. gingivalis</i>
Chan y Lai ¹⁴⁵	Láser helio/neón ⁽¹⁾ , LED ⁽²⁾	<i>In vitro</i>	Azul de metileno	632,8 nm ⁽¹⁾ , 665 y 830 nm ⁽²⁾	30 mW ⁽¹⁾ y 100 mW ⁽²⁾	30 seg ⁽¹⁾ y 60 seg ⁽²⁾	<i>A. a.</i> <i>F. nucleatum</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i> <i>S. sanguis</i>
Feuerstein y cols. ¹³⁷	Halógena ⁽¹⁾ , LED ⁽²⁾ (Mini Led®) y arco de plasma ⁽³⁾	<i>In vitro</i>	No usan	400-500 nm	260-416 ⁽¹⁾ , 520 ⁽²⁾ y 1144 ⁽³⁾ mW/cm ²	1-3 min	<i>P. gingivalis</i> <i>F. nucleatum</i> <i>S. mutans</i> <i>S. faecalis</i>
Soukos y cols. ¹⁴⁰	Lámpara de haluro metálico	<i>In vitro</i>	No usan	380-520 nm	70 mW/cm ²	Datos no disponibles	<i>P. nigrescens</i> <i>P. melaninogenica</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i>
Sterer y Feuerstein ¹⁴³	Luz xenón	<i>In vitro</i>	No usan	400-500 nm	1,14 W/cm ²	30-240 seg	Bacterias gram-negativas
Feuerstein y cols. ¹⁴¹	Lámpara halógena (Elipar®), de arco de plasma y LED (Mini LED®)	<i>In vitro</i>	No usan	400-500 nm	520 mW/cm ²	1-3 min	<i>P. gingivalis</i> <i>F. nucleatum</i>
Ramos y cols. ¹⁵⁸	LED (Helbo® Blue)	<i>In vivo</i>	Cloruro de fenazationio	660 nm	60 mW/cm ²	1 min por diente	Datos no disponibles
Andersen y cols. ¹⁵⁹	LED (Periowave®)	<i>In vivo</i>	Azul de metileno	670 nm	150 mW	60 seg	Datos no disponibles
Fimple y cols. ¹⁶⁰	Luz roja LED	<i>In vitro</i>	Azul de metileno	665 nm	1 W	5 min	Datos no disponibles
Braun y cols. ¹⁶¹	LED (Helbo® Blue)	<i>In vivo</i>	Cloruro de fenazationio	660 nm	100 mW	1 min por diente	Datos no disponibles
Christodoulides y cols. ¹⁴⁷	LED (Helbo® Blue)	<i>In vivo</i>	Cloruro de fenazationio	670 nm	75 mW	1 min por diente	Datos no disponibles
Fukui y cols. ¹⁵	Luz monocromática azul	<i>In vitro</i>	No usan	405 nm	50-400 mW/cm ²	38-300 seg	<i>P. gingivalis</i>
Xu y cols. ¹⁶²	Luz roja	<i>In vitro</i>	Azul de metileno	665 nm	10-40 mW/cm ²	5 min	Datos no disponibles
Fontana y cols. ¹⁴⁴	LED (BWTEK®)	<i>In vitro</i>	Azul de metileno	665 nm	100 mW/cm ²	5 min	Datos no disponibles

Tabla 7. Terapia fotodinámica en odontología.

Autores	Tipo de lámpara	Tipo de estudio	Agente fotosensitizador	Longitud de onda	Potencia media	Tiempo de aplicación	Bacterias afectadas por la terapia
Al-Zahrani y Austah ¹⁶³	LED (Periowave [®])	<i>In vivo</i>	Azul de metileno	670 nm	Datos no disponibles	60 seg	Datos no disponibles
Polansky y cols. ¹⁴⁶	LED (Helbo [®] Blue)	<i>In vivo</i>	Cloruro de fenazationio	680 nm	75 mW/cm ²	1 min por diente	<i>P. gingivalis</i>
Chondros y cols. ¹⁶⁴	LED (Helbo [®] Blue)	<i>In vivo</i>	Cloruro de fenazationio	670 nm	75 mW/cm ²	1 min por diente	Datos no disponibles
Lulic y cols. ¹⁶⁵	LED (Helbo [®] Blue)	<i>In vivo</i>	Cloruro de fenazationio	670 nm	75 mW/cm ²	1 min por diente	Datos no disponibles
Rühling y cols. ¹⁵⁰	LED (Save Dent [®])	<i>In vivo</i>	Cloruro de tolonio	635 nm	100 mW	1 min por diente	Datos no disponibles
Chui y cols. ¹³⁹	LED azul y LED roja (Fotosan [®])	<i>In vitro</i>	No usan	425-500 nm (azul) y 625-635 nm (roja)	4 W/cm ² (azul) y 2 W/cm ² (roja)	90 seg (azul) y 180 seg (roja)	<i>P. gingivalis</i>
Soukos y cols. ¹⁶	LED	<i>In vivo</i>	No usan	415-495 nm	70 mW/cm ²	16 min	<i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i> <i>P. melaninogenica</i> <i>P. nigrescens</i>
Song y cols. ¹³⁸	Lámpara halógena (Curing Light XL 3000 [®])	<i>In vitro</i>	No usan	400-520 nm	500 mW/cm ²	15, 30, 60, 90 y 120 seg	<i>A. a.</i> <i>P. gingivalis</i> <i>F. nucleatum</i>
López-Jiménez y cols. ¹⁵⁴	LED (FotoSan ^{®(1)} y Periowave ^{®(2)})	<i>In vitro</i>	Azul de toluidina O ⁽¹⁾ y azul de metileno ⁽²⁾	620-640 nm ⁽¹⁾ y 670 nm ⁽²⁾	1000 mW ⁽¹⁾ y 280 mW ⁽²⁾	30 seg ^(1,2)	<i>E. faecalis</i>
García y cols. ¹⁵³	Láser (Theraoy XT-EC [®])	<i>In vivo</i>	Azul de metileno	660 nm	100 mW	90 seg	Datos no disponibles
Chisatzi y cols. ¹⁴⁸	Luz láser (Handy Laser Sprint [®])	<i>In vivo</i>	Cloruro de toluidina	638 nm	Datos no disponibles	120 seg	<i>P. gingivalis</i>
Soria-Lozano y cols. ¹⁵⁵	Lámpara de haluro metálico	<i>In vitro</i>	Azul de metileno, rosa de Bengala y curcumina	420-700 nm	90 mW/cm ²	6 min y 51 seg	<i>S. sanguis</i> <i>S. mutans</i> <i>C. albicans</i> (hongo)
Fayyaz y cols. ¹⁵⁶	Lámpara de tungsteno	<i>In vitro</i>	N-metil-3-piridil, N-metil-4-piridil y sus compuestos de zinc (compuestos tetracatiónicos)	Datos no disponibles	100 W	30 min	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>
Pessoa y cols. ⁸⁰	Láser de diodos aluminio-galio-indio-fósforo (Flashlase III [®])	<i>In vivo</i>	Azul de toluidina	660 nm	100 mW	23 seg (1 vez/7 días durante 5 semanas)	<i>A. actinomycetemcomitans</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. melaninogenica</i> <i>P. intermedia</i> <i>P. nigrescens</i>
Annaji y cols. ¹⁴⁹	LED (AMD Picasso [®])	<i>In vivo</i>	Azul de toluidina O	1	1 W	30 seg	<i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i> <i>A. actinomycetemcomitans</i>

Tabla 7 (continuación). Terapia fotodinámica en odontología.

2.7.5. EFECTOS SECUNDARIOS DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA

Como todo tratamiento, la terapia fotodinámica puede presentar efectos secundarios, aunque en el campo de la odontología no son especialmente relevantes.

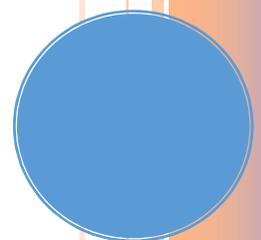
Algunos autores aseguran que no hay dolor, malestar o irritación intraoral asociados al empleo de esta terapia. El sangrado con el sondaje disminuye por igual en las superficies irradiadas o no, mientras que el índice de placa es ligeramente menor en el lado objeto de estudio. La mayor diferencia se observa en el eritema gingival, que mengua con la aplicación de la luz, pudiendo tener por tanto ésta actividad antiinflamatoria y antibacteriana simultáneamente. Globalmente, no se observan efectos secundarios tras las ocho exposiciones a la luz azul a 455 nm con una energía de 67,2 J/cm². El motivo de ello puede ser que la energía de la misma disminuye al atravesar los tejidos y, por ello, las células que se encuentran dentro de ellos absorben mucha menor energía que las que están en superficie^{16,147}.

In vivo, se observa histológicamente, aún con la máxima concentración de azul de toluidina y de luz (1 mg de azul de toluidina por mililitro más 48 J de luz), que no se forma ninguna úlcera en el epitelio o inflamación del tejido conectivo, habiendo solamente correlación positiva de importancia respecto al nivel de pérdida ósea con estas proporciones¹⁵².

Otros efectos descritos son hipersensibilidad y desmineralización del esmalte, para lo cual aplican una solución neutra de flúor, remitiendo por completo los síntomas y signos en ambos casos. En este estudio fue empleado un láser de diodos aluminio-galio-indio-fósforo (70 J/cm²), probablemente causante de estos problemas, y azul de toluidina⁸⁰.

Sin embargo, se debe ajustar el tiempo de irradiación porque causa malestar y respuestas evasivas por parte del paciente¹⁵³.

3. JUSTIFICACIÓN



3. JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los *biofilms* están constituidos probablemente por agrupaciones de especies que interactúan entre ellas de un modo antagonista o con efecto sinérgico. Sin embargo, existe poco conocimiento de la estructura, características (incluyendo la dinámica de la comunidad) o la respuesta a los agentes microbianos¹⁶⁶.

Respecto a la flora microbiana, la cavidad oral representa uno de los lugares más densamente poblados del cuerpo humano. La diversidad de ambientes de la misma provoca el establecimiento de distintas comunidades microbianas, como la placa supra y subgingival y el dorso de la lengua. Las características del entorno determinan qué microorganismos pueden ocupar un lugar, mientras que las actividades metabólicas de estas comunidades microbianas modifican en consecuencia las propiedades del entorno. Los microorganismos sacarolíticos en la zona supragingival realizan la fermentación de los carbohidratos en, principalmente, ácido láctico, y crean un ambiente ácido que permanece temporalmente. Al contrario, en la zona subgingival, los microorganismos asacarolíticos metabolizan los compuestos nitrogenados derivados del fluido gingival crevicular y originan un pH neutral y un entorno anaeróbico en el que abundan los ácidos grasos de cadena corta y amoníaco. En el dorso de la lengua, la actividad asacarolítica sobre la cisteína y la metionina da lugar a compuestos sulfurosos, los principales responsables del mal olor.

Además, los cambios en los factores ambientales pueden estimular el desarrollo de respuestas adaptativas en los microorganismos de manera individual que causarían un cambio en las condiciones ambientales e introducirían mayor número de microorganismos patógenos en la comunidad microbiana¹⁶⁷.

La formación de la placa dental empieza con los colonizadores primarios, predominantemente estreptococos y actinomicetes, entre otros. La saliva es la mayor fuente de nutrientes para las bacterias en los *biofilms* orales. Se trata de una mezcla de proteínas complejas y glicoproteínas que no pueden ser digeridas fácilmente. Para su completa degradación, se requiere de la actividad conjunta de distintas enzimas.

Además, esta función se lleva a cabo de forma más eficaz cuando participan a la vez agrupaciones de diferentes bacterias que si lo realizasen las mismas de forma aislada⁹⁹.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, colonizador primario, es capaz de interactuar con la película de proteínas de la saliva, al igual que los estreptococos. Las superficies lisas están más expuestas al medio ambiente y pueden ser solo colonizadas por un número limitado de especies adaptadas a esas condiciones aerobias.

Las áreas interproximales y el surco gingival son zonas que no están tan expuestas a la acción del cepillado ni a la autoclisis por parte de la saliva y, por ello, ofrecen mayor protección a los microorganismos. Además, el fluido crevicular gingival, que se ve aumentado durante la inflamación gingival y la enfermedad periodontal, es rico en nutrientes. Factores esenciales como la hemina para las bacterias pigmentadoras de negro pueden ser obtenidas de la degradación de hemopexina, hemoglobina y haptoglobina⁸.

P. gingivalis tiene una capacidad remarcable para interactuar con una gran variedad de colonizadores iniciales, medianos y tardíos de la placa dental. Esta bacteria no puede crecer *in vitro* como una especie única, necesita de la asociación con *Veillonella* spp., *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces oris*, *A. actinomycetemcomitans* y *Fusobacterium nucleatum*. El resultado de esta investigación demostraría la presencia, de este modo, de *P. gingivalis* en todas las fases del desarrollo de la placa dental¹⁶⁸.

Según la placa dental va creciendo en complejidad, se forman distintos microambientes en el *biofilm* que dan lugar a nuevos nichos para los colonizadores tardíos, como *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola*⁹⁹. A nivel subgingival, cuando hay inflamación y sangrado, hay mayor producción de hemina y *P. gingivalis* aprovecha para nutrirse descomponiendo esta molécula. Al mismo tiempo, se ocasiona un aumento en los niveles de este microorganismo gracias a la ayuda de *F. nucleatum* que actuaría como “basurero” del oxígeno y mantendría el ambiente anaerobio¹⁶⁹.

Paralelamente, las vesículas de *P. gingivalis* participan de forma importante en la agregación de *T. forsythia*, reforzando las interacciones físicas entre bacterias¹⁷⁰. A la inversa, la capa en forma de S de *T. forsythia* (fig. 10) es uno de los “obstáculos” frente a los factores inmunes y tiene facultad de unirse a *Streptococcus Sanguinis*, *S. salivarius*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum*¹⁰¹. En concreto, mediante espectrofotometría de masas, se observa el vínculo entre *T. forsythia* y *P. gingivalis* gracias a una proteína de la membrana externa de la primera¹⁷¹.

De este modo, *T. forsythia* mediaría en la colonización a través de la coagregación bacteriana, proceso esencial para la adhesión entre unas bacterias y otras, promoviendo así la formación de biopelículas mixtas y regulando la expresión de moléculas bacterianas que desencadenarían la liberación de citoquinas, las cuales inducen la inflamación¹⁷². Tras la inflamación y sangrado gingival, se liberarían moléculas como la hemoglobina, indispensable para el crecimiento de *P. gingivalis*.

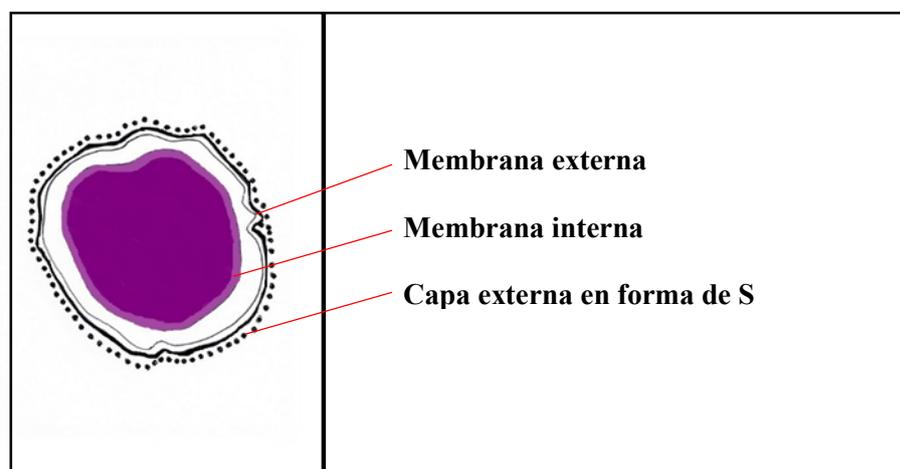
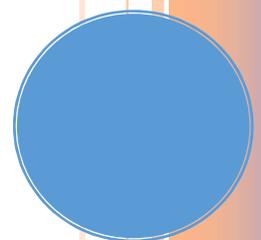


Fig. 10. Corte transversal de *Tannerella forsythia*¹⁷³.

En resumen, la potencial capacidad de los microorganismos de establecer unas interacciones tan complejas intensifica la posibilidad de la instauración de un ecosistema microbiano patógeno que favorece la aparición de enfermedades dentales, como la periodontitis o la caries. La prevalencia de estas enfermedades es, lamentablemente, muy alta en las sociedades industrializadas, sin contar con los costes asumidos por los gobiernos y/o los individuos afectados por ellas y podrían, en un futuro, ser prevenibles.

Basándose en estas observaciones, en la presente tesis doctoral se propuso investigar la posible relación de las bacterias *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *T. forsythia* con las tinciones extrínsecas negras (antes y después de la terapia fotodinámica), ya que no se ha realizado hasta el momento ningún estudio en profundidad sobre el tema.

4. OBJETIVOS



4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Observar el efecto de la aplicación de una fuente de luz de diodos con una longitud de onda de aproximadamente 475 nm en la superficie bucal de los dientes con pigmentación extrínseca negra de origen bacteriano.

4.1.1. HIPÓTESIS NULA

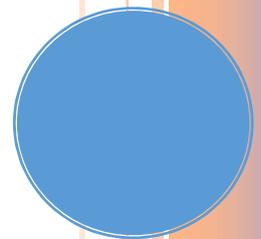
No se observarán cambios en la reaparición de las pigmentaciones tras la aplicación de una fuente de luz de diodos con una longitud de onda de aproximadamente 475 nm en la superficie bucal de los dientes con pigmentación extrínseca negra.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar los cambios en el tiempo de restauración de las pigmentaciones después de la aplicación de una fuente de luz de diodos con una longitud de onda de aproximadamente 475 nm en la superficie bucal de los dientes con pigmentación extrínseca negra.
- Observar los cambios producidos en la cantidad de pigmentación extrínseca negra tras la aplicación de una fuente de luz de diodos con una longitud de onda de aproximadamente 475 nm en la superficie bucal de los dientes.
- Observar los cambios producidos en el color de la pigmentación tras la aplicación de una fuente de luz de diodos con una longitud de onda de aproximadamente 475 nm en la superficie bucal de los dientes con pigmentación extrínseca negra.

- Observar los cambios producidos en la microflora de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* y *Porphyromonas gingivalis* tras la aplicación de una fuente de luz de diodos con una longitud de onda de aproximadamente 475 nm en la superficie bucal de los dientes con pigmentación extrínseca negra.

5. MUESTRA Y MATERIAL



5. MUESTRA Y MATERIAL

5.1. MUESTRA

Para este estudio se analizó la placa dental de pacientes adultos con manchas dentarias extrínsecas negras de origen bacteriano, antes y después de aplicar una fuente de luz azul LED, y se valoraron los cambios ocurridos en las pigmentaciones en el tiempo, el color y la cantidad de pigmento después de aplicar la luz.

El protocolo para la investigación en humanos fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad CEU-Cardenal Herrera.

5.1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se incluyeron sólo aquellos pacientes que presentaron manchas dentarias extrínsecas negras de origen bacteriano.

5.1.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se excluyeron del estudio:

- Pacientes menores de 18 años.
- Embarazadas.
- Pacientes que hubiesen tomado antibiótico hasta 15 días antes de la recogida de la muestra.
- Pacientes a los que, después de realizarse la primera limpieza dental, no les volvieron a aparecer las manchas.

5.2. MATERIAL

5.2.1. MATERIAL PARA LA TOMA DE FOTOGRAFÍAS

- Cámara fotográfica Canon® eos 500d con flash anular Ringlite MR-14 EX (Canon España, Madrid, España).
- 2 retractores de mejillas de plástico esterilizables (Henry Schein® Dental Deutschland GmbH, Weinheim, Germany).
- 1 espejo oclusal adulto (Henry Schein® Dental Deutschland GmbH, Weinheim, Germany).

5.2.2. MATERIAL PARA LA TOMA DE MUESTRAS

- Curetas de plástico esterilizables (Miraclean-Implant Black núm.3) (Hager & Werken® GmbH & Co. KG, Duisburg, Germany) (fig. 11).
- Rollos de algodón salivar Monoart® núm. 2 (Euronda®, Vicenza, Italy).
- Puntas de papel estériles ISO 50 (Dentsply Maillefer®, Ballaigues, Switzerland).
- Tubos Eppendorf estériles 0,5 ml (Eppendorf Ibérica®, S.L., Madrid, España).
- Pinzas Pulgar (Henry Schein® Dental Deutschland GmbH, Weinheim, Germany).
- Espejo dental tamaño 3 (20 mm) (Henry Dental® Deutschland GmbH, Weinheim, Germany).
- Sondas dentales # 6 Cybertech® (DHB-Oral Healthcare, Surrey, United Kingdom).



Fig. 11. Cureta Miraclear-Implant Black núm. 3 (fuente: autor).

5.2.3. MATERIAL PARA LA PROFILAXIS DENTAL

- Punta de ultrasonidos núm. 1L (Sirona Dental[®], Salzburgo, Austria).
- Tazas de goma dura Palanca CA (Henry Schein[®] Dental Deutschland GmbH, Weinheim, Germany).
- Pasta abrasiva para profilaxis de grano fino Hawe Cleanic[®] (Kerr Dental, Bioggio, Switzerland).

5.2.4. MATERIAL PARA EL TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

- Acumuladores rígidos negativos -21°C (Best Distribution Practices[®], S.L., Barcelona, España).
- Nevera portátil de corcho.
- Termómetro digital con pantalla LCD.
- Gradillas microtubos Eppendorf.
- Frigorífico Fagor FFK462X[®] de frío cíclico con regulación electrónica de la temperatura (Fagor Electrodomésticos, S. Coop., Guipúzcoa, España).

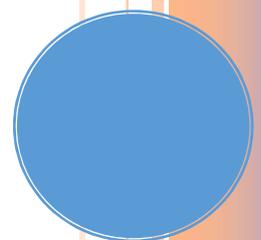
5.2.5. MATERIAL PARA LA TERAPIA FOTODINÁMICA

- Dispositivo de blanqueamiento de uso domiciliario GLO Brilliant (GLO[™] Science LLC, New York, America) (fig. 12).



Fig. 12. Dispositivo de blanqueamiento de uso domiciliario GLO Brilliant (fuente: autor).

6. PROCEDIMIENTO



6. PROCEDIMIENTO

6.1. OBSERVACIÓN, RECOGIDA DE MUESTRAS Y PROFILAXIS DENTAL

6.1.1. PRIMERA CITA (Tiempo 0)

- Antes de la visita: se anotó la fecha de la última profilaxis dental recibida por el paciente.

- Diagnóstico clínico de la pigmentación extrínseca negra: se siguió la clasificación elaborada por Gasparetto, que engloba también los criterios de Shourie y Koch⁷². Las puntuaciones se anotaron en un diagrama (anexo A) para los siguientes controles:
 - Puntuación 1: puntos pigmentados o líneas incompletas paralelas al margen gingival.
 - Puntuación 2: líneas continuas pigmentadas, fácilmente observables y limitadas a la mitad del tercio cervical de la superficie dental.
 - Puntuación 3: pigmentación que se extiende más allá del tercio cervical.

- Realización de fotografías: se tomaron fotografías por sextantes de la cavidad oral con una cámara fotográfica Canon® eos 500d con flash anular Ringlite MR-14 EX (Canon España, Madrid, España) y retractores de mejillas de plástico (Henry Schein® Dental Deutschland GmbH, Weinheim, Germany), además de una fotografía completa de toda la arcada inferior por lingual y de la arcada superior por palatino con espejo oclusal (Henry Schein® Dental Deutschland GmbH, Weinheim, Germany). Éstas sirvieron para el control posterior del crecimiento de la pigmentación.

- Recogida de muestras de placa bacteriana con tinción negra (fig. 13): aproximadamente fue recogido 1 mg de placa bacteriana de las superficies bucal y/o lingual, raspando las superficies dentales con una cureta de plástico Miraclean-Implant Black núm. 3 (Hager & Werken® GmbH & Co. KG, Duisburg, Germany) para evitar la remoción innecesaria de hidroxapatita del esmalte. Se aisló previamente la zona con rollos de algodón para que no hubiese invasión de microorganismos procedentes de la saliva⁹⁷. Después, las muestras fueron transferidas a puntas de papel de endodoncia ISO 50 estériles (Dentsply Maillefer®, Ballaigues, Switzerland) y almacenadas en tubos Eppendorf de 0,5 ml (Eppendorf Ibérica®, S.L., Madrid, España) libres de DNA y RNA^{20 81}, para observar la presencia de las bacterias *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* y *Porphyromonas gingivalis*.



Fig. 13. Toma de muestras de placa bacteriana negra (fuente: autor).

- Profilaxis dental: Se procedió a la limpieza dental profesional para eliminar las pigmentaciones con una punta de ultrasonidos núm. 1L (Sirona Dental®, Salzburgo, Austria), copa de goma dura Palanca CA (Henry Schein® Dental Deutschland GmbH, Weinheim, Germany) y pasta abrasiva para profilaxis de grano fino Hawe Cleanic® (Kerr Dental, Bioggio, Switzerland).

6.1.2. REVISIONES (al mes del Tiempo 0 y consecutivamente cada mes)

Se llevaron a cabo revisiones mensualmente hasta alcanzar el Tiempo de Reparación. En estas citas de revisión se efectuaron:

- Fotografías.
- Diagnóstico clínico de la pigmentación.

6.1.3. TIEMPO DE REPARACIÓN respecto al Tiempo 0

El Tiempo de Reparación se definió como el espacio de tiempo comprendido entre la primera visita y la aplicación de la luz. Este tiempo se utilizó posteriormente para comparar los cambios producidos después de aplicar la luz en el tiempo, color y cantidad del pigmento.

En esta visita se procedió al:

- Diagnóstico clínico de la pigmentación extrínseca negra: debía coincidir con el valor obtenido en la primera cita.
- Realización de fotografías.
- Profilaxis dental.
- Aplicación de la luz: Se empleó un dispositivo de blanqueamiento de uso domiciliario GLO Brilliant (GLO™ Science LLC, New York, America) con luz de diodos azul y con una longitud de onda de aproximadamente 475 nm, con el objetivo de inactivar las bacterias y detener su crecimiento^{13,16}. La luz se aplicó en la superficie bucal de los dientes durante 8 minutos, seguido de una pausa y una segunda aplicación de 8 minutos más con otra lámpara idéntica (figs. 14 y 15).



Fig. 14. Aplicación de la terapia fotodinámica (foto: autor).



Fig. 15. Aplicación de la terapia fotodinámica (foto: autor).

Este protocolo¹⁶ se basa en el empleo con un dispositivo fabricado por los mismos autores que constaba de tres luces LED de color azul.

6.1.4. REVISIONES (al mes del Tiempo de Reparación y consecutivamente cada mes)

Se realizaron revisiones mensualmente hasta alcanzar el Tiempo de Restauración. En estas citas de revisión se procedió al:

- Diagnóstico clínico de la pigmentación extrínseca negra.
- Realización de fotografías.

6.1.5. TIEMPO DE RESTAURACIÓN

El tiempo de Restauración se definió como el espacio de tiempo comprendido entre la aplicación de la luz y el momento en el que el valor de la pigmentación extrínseca negra coincidió con el anotado para el Tiempo 0. Este tiempo se utilizó posteriormente para comparar los cambios producidos después de aplicar la luz en el tiempo, color y cantidad del pigmento. Un esquema (fig. 16) a modo de resumen para facilitar la comprensión de la metodología es el que se muestra a continuación:

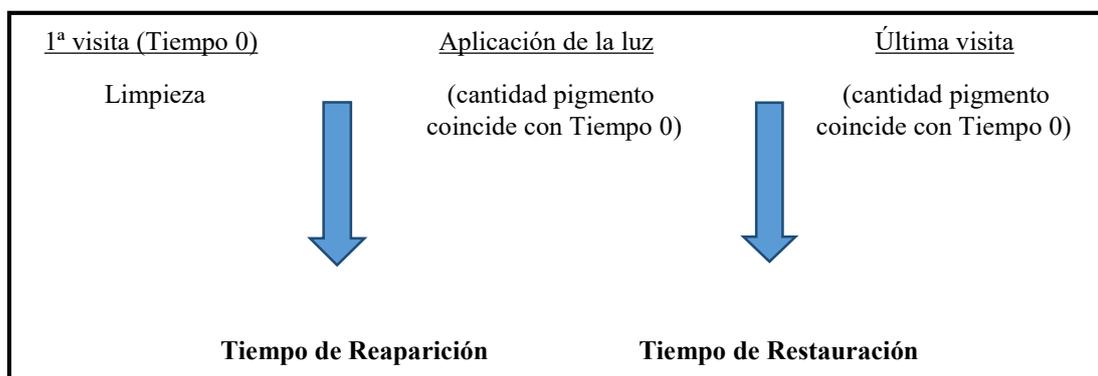


Fig. 16. Metodología empleada en la presente tesis doctoral.

En esta visita se llevó a cabo:

- Diagnóstico clínico de la pigmentación extrínseca negra: había de coincidir con el valor obtenido antes de la aplicación de la luz. En el caso de que la pigmentación no llegase a alcanzar la misma apariencia que antes de la aplicación de la luz, y el pigmento mantuviese las mismas características durante dos meses seguidos, se consideró alcanzado el Tiempo de Restauración.
- Realización de fotografías.
- Recogida de muestras de placa bacteriana en el momento se alcanzase el Tiempo de Restauración propio de cada paciente.

6.2. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Una vez las muestras se recogieron en los tubos Eppendorf, éstos fueron almacenados y debidamente etiquetados en gradillas adecuadas para los mismos dentro de una nevera de corcho apta para el transporte con acumuladores rígidos negativos de -21°C (Best Distribution Practices[®], S.L., Barcelona, España), siendo la temperatura del interior controlada en todo momento por un termómetro digital con pantalla LCD.

A continuación, las muestras de placa se conservaron en un frigorífico Fagor FFK462X[®] (Fagor Electrodomésticos, S. Coop., Guipúzcoa, España) congeladas a -20°C hasta que fueron retiradas por el laboratorio para su análisis.

6.3. RECOPIACIÓN DE DATOS CLÍNICOS

Una vez recopiladas las fotografías intraorales y los datos del diagnóstico clínico de la pigmentación en un odontograma (anexo A) para cada paciente, se procedió a su análisis del modo siguiente:

- Para los cambios en el Tiempo de Reparación y de Restauración de la pigmentación, se tuvo en cuenta el intervalo de tiempo comprendido desde el T0 al Tiempo de Reparación (antes de aplicar la luz) y el intervalo de tiempo comprendido desde el Tiempo de Reparación al Tiempo de Restauración (después de aplicar la luz).

- Para los cambios en la cantidad de la pigmentación, se anotaron mensualmente los mismos después de la aplicación de la luz hasta alcanzar el Tiempo de Restauración, otorgando la siguiente puntuación:
 - Puntuación 0: no hay mancha extrínseca negra.
 - Puntuación 1: hay menor cantidad de mancha extrínseca negra comparado con la correspondiente revisión mensual efectuada antes de la aplicación de la luz (en el Tiempo de Reparación).
 - Puntuación 2: la cantidad de mancha extrínseca negra es la misma comparado con la correspondiente revisión mensual efectuada antes de la aplicación de la luz (en el Tiempo de Reparación).
 - Puntuación 3: hay mayor cantidad de mancha extrínseca negra comparado con la correspondiente revisión mensual efectuada antes de la aplicación de la luz (en el Tiempo de Reparación).

- Para los cambios en el color de la pigmentación, se anotaron mensualmente los mismos, tanto antes como después de aplicar la luz, otorgando las siguientes puntuaciones:
 - Puntuación 0: no hay mancha extrínseca negra.
 - Puntuación 1: las manchas extrínsecas negras de origen bacteriano son de una tonalidad más clara que el negro respecto al color de las manchas observado en el mes correspondiente del Tiempo de Reparación.
 - Puntuación 2: las manchas extrínsecas de origen bacteriano tienen una tonalidad negra.

Además de lo anteriormente expuesto, se comparó de igual modo la placa bacteriana de las pigmentaciones extrínsecas negras tomada al principio del estudio con la obtenida tras la aplicación de la luz con el fin de observar si hubo cambios en la presencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* y *Porphyromonas gingivalis*.

A tal fin, se utilizaron los datos analizados por el laboratorio genético para cada paciente mediante el análisis bacteriológico según la técnica de la PCR cuantitativa.

6.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

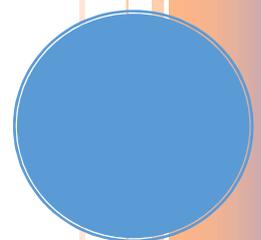
El análisis estadístico de los datos resultantes de la investigación se llevó a cabo mediante el Análisis Bivariante, que engloba todos los contrastes estadísticos siguientes, necesarios para demostrar las correlaciones entre parámetros.

Para comprobar la reproducibilidad del método de medición, se realizó un estudio de test-retest y así evaluar la precisión del observador (error intra-observador). Después, con el fin de medir la concordancia entre los resultados, se usó el índice Kappa, considerando el valor de 0 como concordancia nula y el valor de 1 como concordancia máxima.

Para determinar si los tiempos de Reparación y Restauración (antes y después de aplicar la luz) son iguales, se empleó la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas. Con el objetivo de detectar cambios en el color, cantidad y en la presencia/ausencia de las bacterias estudiadas tras la intervención con luz, se utilizó el test de McNemar para muestras relacionadas. Además, también se usaron dos extensiones a la prueba de McNemar, el Contraste de Simetría en tablas $j \times j$ y el test chi-cuadrado de homogeneidad marginal.

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

7. RESULTADOS



7. RESULTADOS

7.1. MUESTRA SELECCIONADA PARA LA INVESTIGACIÓN

Se dispuso de una muestra inicial de 38 pacientes adultos con pigmentaciones extrínsecas negras de origen bacteriano. De estos 38 pacientes, solo 31 terminaron el tratamiento propuesto según el protocolo establecido hasta el final de la investigación. Los restantes pacientes, en concreto siete, fueron excluidos de la investigación o abandonaron el tratamiento por diferentes motivos, entre los cuales figuran:

- No presentarse a las citas de revisión (cinco pacientes), imposibilitando así el control y/o seguimiento de la pigmentación.
- No cumplir con el protocolo establecido por la investigación (un paciente), alterando por tanto los resultados de la misma.
- No mostrar pigmentaciones extrínsecas negras en las superficies dentales tras la profilaxis dental habitual sin llegar a practicársele la terapia fotodinámica (un paciente), es decir, por otras causas ajenas al estudio las manchas desaparecieron por completo de forma gradual.

A los 31 pacientes pertenecientes a la muestra final se les analizaron los cambios producidos en las pigmentaciones extrínsecas negras con respecto al tiempo, la cantidad y el color de las mismas tras la aplicación de la luz. Asimismo, se evaluó la presencia/ausencia de las bacterias *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythia*, antes y después del empleo de la terapia fotodinámica.

7.2. REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO DE MEDICIÓN DE LAS PIGMENTACIONES EXTRÍNSECAS NEGRAS

Para comprobar que el método de medición empleado para clasificar el grado de pigmentación extrínseca negra presente en cada diente era reproducible y, por tanto, fiable como herramienta útil y objetiva, analizamos el grado de precisión del observador. Es decir, realizamos una validación interna de nuestro protocolo.

La precisión de un procedimiento analítico expresa el nivel de concordancia (grado de dispersión) de una serie de medidas múltiples obtenidas de una muestra homogénea bajo unas determinadas condiciones descritas. La precisión se debe considerar en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. Estos términos se describen a continuación:

- **Repetibilidad:** expresa, en las mismas condiciones de medición, la concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas de la misma magnitud comprobada.
- **Precisión intermedia:** expresa las variaciones obtenidas en un mismo laboratorio o lugar durante un tiempo prolongado (distintos días, análisis, equipamiento...).
- **Reproducibilidad:** es la precisión de concordancia entre los resultados de observaciones del mismo observador realizados bajo condiciones variables de medición.

Dicho esto, se llevó a cabo un estudio de test-retest para evaluar la precisión del observador. Para ello, fueron seleccionadas al azar por una persona totalmente ajena al estudio diez fotografías de pacientes con pigmentaciones extrínsecas negras. Después, se procedió a la determinación de la pigmentación según los criterios de Gasparetto⁷², realizando dos mediciones más sobre las mismas imágenes con un intervalo de diez días entre la primera y la segunda medición y de 15 días entre la segunda y la tercera. Así, se pudo comprobar los parámetros de repetibilidad, precisión intermedia (en distintos días) y de reproducibilidad.

Este procedimiento para comprobar la validación y la exactitud del método se efectuó utilizando imágenes, según lo descrito previamente en la literatura^{174,175}.

El número total de piezas dentarias valoradas fue de 101, y en las mediciones siguientes los resultados positivos (los dientes que presentaban el mismo nivel de pigmentación que en la primera medición o día 0) fueron de un total de 93 y de 92 (segunda y tercera medición, respectivamente) (tabla 8).

Imagen	Día 0	Segunda medición (casos positivos)	Tercera medición (casos positivos)
1	12	11	11
2	12	12	11
3	17	16	16
4	9	7	9
5	14	12	11
6	8	8	6
7	12	11	12
8	7	7	7
9	6	5	5
10	4	4	4
TOTAL	101	93	92

Tabla 8. Valoración de las piezas dentarias para comprobar la reproducibilidad del método.

El índice empleado para comprobar la reproducibilidad del método de medición de la pigmentación fue el índice Kappa, ya que evalúa la concordancia entre los resultados proporcionados en distintos tiempos (test-retest). El parámetro varía de 0 a 1, siendo 0 concordancia nula y 1 concordancia máxima. En este caso, el valor del índice de Kappa es de **0,855** lo que indica, en consecuencia, que **la precisión del método es óptima**.

7.3. RESULTADOS RESPECTO A LOS CAMBIOS PRODUCIDOS EN LAS PIGMENTACIONES TRAS LA TERAPIA FOTODINÁMICA

7.3.1. CAMBIOS EN EL TIEMPO

En este apartado se deben considerar dos aspectos fundamentales, el llamado **Tiempo de Reparación** (antes de aplicar la luz, es decir, el intervalo de tiempo normal tras una profilaxis dental en el cual vuelven a aparecer las manchas hasta que adquieren el mismo nivel de pigmentación que justo antes de la profilaxis) y el **Tiempo de Restauración** (después de aplicar la luz, es decir, el intervalo de tiempo normal tras una nueva profilaxis dental seguida de la aplicación de la terapia fotodinámica en el cual vuelven a aparecer las manchas hasta que adquieren el mismo nivel de pigmentación que justo antes de la profilaxis).

Considerados estos aspectos, es importante recalcar la gran variabilidad existente para cada paciente de forma individual y entre pacientes diferentes. El siguiente gráfico (fig. 17) muestra el Tiempo de Reparación y el de Restauración (en meses) para cada paciente.

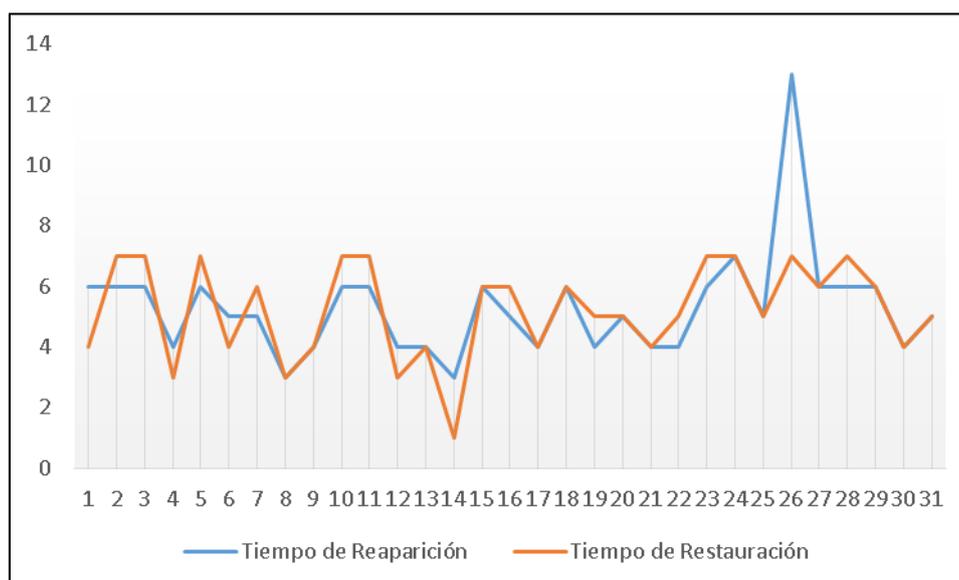


Fig. 17. Tiempo de Reparación y Restauración para cada paciente.

El valor medio en el Tiempo de Reparación para las pigmentaciones extrínsecas negras fue de 5,2 meses, igual que la media en el Tiempo de Recuperación presentó el mismo valor (5,2 meses).

Según las pruebas de Kolmogorov-Smirnov, el Tiempo de Reparación no se distribuye normalmente (0,015; $p < 0,015$), mientras que el de Restauración sí (0,603; $p > 0,05$). Por tanto, con el fin de contrastar que ambos tiempos eran iguales se empleó una prueba no paramétrica de comparación de distribuciones para muestras repetidas de Wilcoxon. El resultado es de 0,762 ($p > 0,05$), lo que demuestra que las medianas de ambos tiempos son estadísticamente iguales, así pues, no existen diferencias significativas entre el Tiempo de Reparación y el Tiempo de Restauración. En resumen, bajo las condiciones de este estudio, **la aplicación de la terapia fotodinámica no altera el intervalo de tiempo en el cual reaparecen de forma natural las pigmentaciones extrínsecas negras**. A continuación se muestra el estudio estadístico descriptivo (tabla 9) respecto a los cambios en el tiempo relatados.

Estudio estadístico descriptivo	N	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	Desviación Típica
Tiempo de Reparación	31	3,00	13,00	5,29	5,00	1,77
Tiempo de Restauración	31	1,00	7,00	5,22	5,00	1,64

Tabla 9. Estudio estadístico descriptivo para valorar los cambios de las pigmentaciones en el tiempo.

7.3.2. CAMBIOS EN LA CANTIDAD

La cantidad de pigmentación extrínseca negra presente en cada diente fue valorada según la clasificación elaborada por Gasparetto, que engloba los criterios de Shourie y Koch⁷². Sin embargo, para poder comparar de forma global (a nivel de ambas arcadas) en cada paciente individualmente los cambios en la cantidad de pigmentación acontecidos antes y tras el empleo de la terapia fotodinámica, fue creada una escala para facilitar este procedimiento.

La escala consta de 4 puntuaciones:

0. No hay mancha extrínseca negra.
1. Menor cantidad de mancha extrínseca negra con respecto al Tiempo de Reparación (antes de aplicar la luz).
2. Misma cantidad de mancha extrínseca negra con respecto al Tiempo de Reparación (antes de aplicar la luz).
3. Mayor cantidad de mancha extrínseca negra con respecto al Tiempo de Reparación (antes de aplicar la luz).

Al efectuar la comprobación de las similitudes existentes entre 2 meses homólogos (uno del Tiempo de Restauración con el pertinente del Tiempo de Reparación) para admitir que ambos presentaban la misma cantidad de pigmentación, se estimó máximo un margen de error de 3 dientes, o sea, se consideró aceptable que 3 dientes del diagrama del Tiempo de Restauración tuviesen una calificación distinta de la cantidad de pigmentación según la clasificación de Gasparetto⁷².

En la siguiente tabla (tabla 10) se representan los cambios producidos en la cantidad de la pigmentación en el Tiempo de Restauración en todos los pacientes, teniendo en cuenta que se comparó el correspondiente diagrama de cada mes del Tiempo de Restauración (después de aplicar la luz) con el respectivo mes del Tiempo de Reparación (antes de aplicar la luz), de acuerdo con la escala citada. El Tiempo de Restauración se consideró alcanzado de acuerdo a las siguientes puntualizaciones:

- Cuando el diagnóstico clínico de la pigmentación extrínseca negra coincidía con el del último mes del Tiempo de Reparación, siendo ambos valores iguales. Por ejemplo, si un paciente tenía un Tiempo de Reparación (antes de la luz) de 4 meses y en el cuarto mes del Tiempo de Restauración (después de la luz) mostraba la misma cantidad de pigmentación según la escala, se consideró alcanzado el Tiempo de Restauración.

- Cuando, sin llegar a ser igual el Tiempo de Restauración al de Reparación, presentaba 2 meses seguidos la misma cantidad de pigmentación según la clasificación elaborada por Gasparetto. Aquí tenemos 4 posibilidades distintas considerando, por ejemplo, un paciente con un Tiempo de Reparación (antes de la luz) de 5 meses:

○ Si en el segundo y tercer mes del Tiempo de Restauración (después de la luz), la cantidad de pigmentación era estable y menor que antes de la luz, se consideró alcanzado el Tiempo de Restauración (presentaba 2 meses seguidos la misma cantidad de pigmentación).

○ A la inversa, si en el mes cuarto del Tiempo de Restauración tenía la misma cantidad de pigmentación que en el mismo mes del Tiempo de Reparación y, sin embargo, en el mes quinto mostraba menor cantidad respecto de su homólogo y en el sexto, la misma cantidad del quinto del Tiempo de Restauración, se consideró alcanzado el mismo (2 meses seguidos).

○ De la misma forma, no obstante, si la pigmentación en el mes cuarto y el quinto del Tiempo de Restauración era estable y menor en ambos casos, se consideró alcanzado el mismo, coincidiendo ambos tiempos de Reparación y Restauración.

○ Por otra parte, si en el mes cuarto del Tiempo de Restauración presentaba mayor cantidad de pigmentación con respecto a su homólogo, mostrando la misma cantidad de pigmentación que la del quinto mes del Tiempo de Reparación, se consideró alcanzado el Tiempo de Restauración.

TIEMPO DE RESTAURACIÓN (MESES)							
PACIENTE	1	2	3	4	5	6	7
1	2	2	1	1	-	-	-
2	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1
4	2	2	3	-	-	-	-
5	1	1	1	1	1	1	1
6	3	3	3	3	-	-	-
7	1	3	2	1	1	1	-
8	1	1	2	-	-	-	-
9	1	1	1	2	-	-	-
10	1	2	2	2	3	1	1
11	1	1	1	1	1	1	1
12	3	3	3	-	-	-	-
13	1	1	2	2	-	-	-
14	3	-	-	-	-	-	-
15	2	2	2	2	2	2	-
16	1	1	1	1	1	1	-
17	2	2	2	2	-	-	-
18	1	1	1	1	2	2	-
19	1	1	1	1	1	-	-
20	1	1	2	2	2	-	-
21	2	2	2	2	-	-	-
22	1	1	1	1	1	-	-
23	1	1	1	1	1	1	1
24	1	1	2	2	2	2	2
25	1	2	2	2	2	-	-
26	2	2	3	3	3	3	3
27	1	1	1	1	2	2	-
28	1	1	1	1	1	1	1
29	1	2	2	2	2	2	-
30	2	2	2	2	-	-	-
31	2	2	2	2	2	-	-

VALORACIÓN DE LA CANTIDAD DE LA PIGMENTACIÓN

0. No hay mancha extrínseca negra
1. Menor cantidad de mancha extrínseca negra con respecto al mismo mes evaluado en el tiempo de reaparición (antes de aplicar la luz)
2. Misma cantidad de mancha extrínseca negra con respecto al mismo mes evaluado en el tiempo de reaparición (antes de aplicar la luz)
3. Mayor cantidad de mancha extrínseca negra con respecto al mismo mes evaluado en el tiempo de reaparición (antes de aplicar la luz)

Tabla 10. Cambios en la cantidad de pigmentación en el Tiempo de Restauración.

El siguiente gráfico (fig. 18) muestra los cambios tras la aplicación de la luz en el primer mes del Tiempo de Restauración, comparado con su equivalente del Tiempo de Reparación (antes de la luz) y, a la vez, se muestran los cambios producidos en el último mes del Tiempo de Restauración con respecto a su homólogo del Tiempo de Reparación. Los resultados muestran que **la aplicación de la terapia fotodinámica es beneficiosa durante el primer mes en un 64,5% de los pacientes, ya que no presentaron la misma cantidad de pigmentación que la alcanzada en el mismo mes tras la profilaxis dental.**

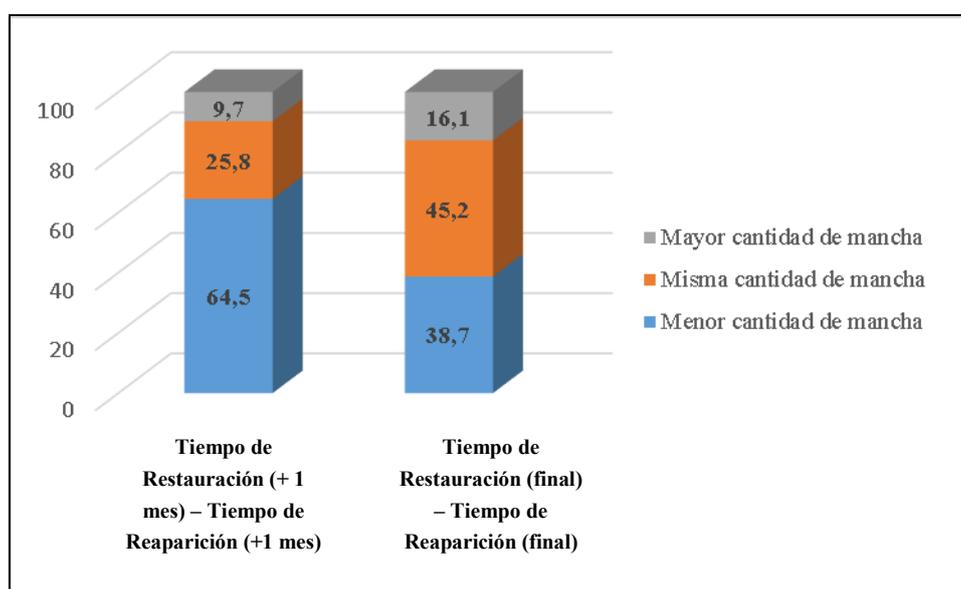


Fig. 18. Cambios en la cantidad de las pigmentaciones en el primer mes del Tiempo de Restauración comparado con el primer mes del Tiempo de Reparación (columna izquierda) y en el último mes del Tiempo de Restauración comparado con el último mes del Tiempo de Reparación (columna derecha).

Alcanzado el Tiempo de Restauración, como indica la figura 18, hay mayor proporción de pacientes que exhiben la misma cantidad de pigmentación extrínseca negra (en concreto, un 45,2%) que al final del Tiempo de Reparación, frente al 38,7% que muestran menor cantidad de pigmentaciones y un 16,1% mayor cantidad. Por ello, se puede llegar a la conclusión de que, a medida que se avanza en el Tiempo de Restauración, aumenta la cantidad de pigmentación. O sea, **se produce un empeoramiento de la cantidad de la pigmentación tras la aplicación de la terapia fotodinámica según pasa el tiempo.**

Para llegar a esta conclusión, no se pudo usar la prueba de McNemar, ya que solo es válida para tablas 2x2 y, en este caso, la escala tiene 4 valores. Por ello, primero se empleó la prueba de simetría (tabla 11) para muestras relacionadas.

		Tiempo de Restauración (final)							
		1		2		3		Total	
		Recuento	% del N de la tabla	Recuento	% del N de la tabla	Recuento	% del N de la tabla	Recuento	% del N de la tabla
Tiempo de Restauración +1 mes	1	11	35,5%	9	29,0%	0	0,0%	20	64,5%
	2	1	3,2%	4	12,9%	3	9,7%	8	25,8%
	3	0	0,0%	1	3,2%	2	6,5%	3	9,7%
	Total	12	38,7%	14	45,2%	5	16,1%	31	100,0%

Tabla 11. Prueba de simetría para muestras relacionadas.

Con la prueba de simetría se deben comparar las proporciones del mismo color (verde, morado y azul), lo cual nos da un valor de 0,004 ($p < 0,005$), significando que esta prueba no es válida.

Como se ha rechazado la última prueba, se procedió a realizar la prueba de marginalidad (tabla 12). En esta última prueba se debe comparar las proporciones marginales (valores en amarillo de la tabla anterior), nuevamente expuestas en la siguiente tabla:

Proporciones marginales por cantidad de pigmentación	1	2	3
Tiempo de Restauración + 1 mes	64,5%	25,8%	9,7%
Tiempo de Restauración (final)	38,7%	45,2%	16,1%

Tabla 12. Prueba de marginalidad.

El resultado de la prueba de marginalidad nos da un valor de $p < 0,05$ ($p = 0,008$), lo que demuestra que la distribución marginal de los cambios de pigmentación en el mes primero del Tiempo de Restauración es distinta del último mes del Tiempo de Restauración (Tiempo de Restauración final). Como conclusión, se puede corroborar que, **pasado el primer mes del Tiempo de Restauración, los pacientes tienden a mostrar igual o mayor cantidad de pigmentaciones de forma progresiva a medida que pasan los meses del Tiempo de Restauración.**

A continuación se muestran imágenes de distintos sujetos del estudio antes y después de la aplicación de la luz (figs. 19-28).



Fig. 19. Paciente A. 5º mes del Tiempo de Reparación.



Fig. 20. Paciente A. 5º mes del Tiempo de Restauración.



Fig. 21. Paciente B. 7º mes del Tiempo de Reparación.



Fig. 22. Paciente B. 7º mes del Tiempo de Restauración.



Fig. 23. Paciente C. 5º mes del Tiempo de Reparación.



Fig. 24. Paciente C. 5º mes del Tiempo de Restauración.



Fig. 25. Paciente D. 1^{er} mes del Tiempo de Reparación. Fig. 26. Paciente D. 1^{er} mes del Tiempo de Restauración.



Fig. 27. Paciente E. 1^{er} mes del Tiempo de Reparación.



Fig. 28. Paciente E. 1^{er} mes del Tiempo de Restauración.

7.3.3. CAMBIOS EN EL COLOR

Las pigmentaciones extrínsecas negras de origen bacteriano, tal y como indica su nombre, presentan normalmente esta coloración. Sin embargo, en los primeros meses de aparición/formación de las mismas, pueden presentar un aspecto más marronáceo, debido al proceso de degradación de la hemoglobina. Por lo tanto, y con el objetivo de poder valorar los cambios producidos en el color de las manchas comparando los meses del Tiempo de Restauración con los respectivos meses del Tiempo de Reparación, se propuso la siguiente escala:

0. No hay mancha extrínseca negra.
1. Mancha extrínseca negra de color más claro o marronácea.
2. Mancha extrínseca de color negro.

Primeramente, para comprobar los cambios producidos en el color de la pigmentación durante el primer mes del Tiempo de Reparación y el último mes del mismo (tras la profilaxis dental, sin aplicar la luz), se aplica la prueba de McNemar (tabla 13) para comparar si la proporción de pacientes que han pasado de menor a mayor cantidad de pigmentación (valores 1 a 2) es la misma que la proporción de pacientes que han pasado de mayor a menor cantidad de pigmentación (valores 2 a 1).

Tiempo de Reparación + 1 mes	Tiempo de Reparación (final)			
	1		2	
	N	% del total	N	% del total
1	0	0,0%	8	25,8%
2	0	0,0%	23	74,2%

Tabla 13. Prueba de McNemar.

Si se cotejan los valores de las celdas resaltadas en amarillo, el p-valor resultante es de 0,008 ($p < 0,05$), lo cual sugiere que las proporciones son estadísticamente significativas. O sea, **ningún paciente muestra mejoría en el color en el primer mes del Tiempo de Reparación (valores 2 a 1) respecto al último mes del mismo, mientras que un 26% de los pacientes exhibe una coloración más clara (valores 1 a 2)**. El resto de pacientes (74%) mantiene el color de la pigmentación a lo largo de todo el proceso (fig. 29).

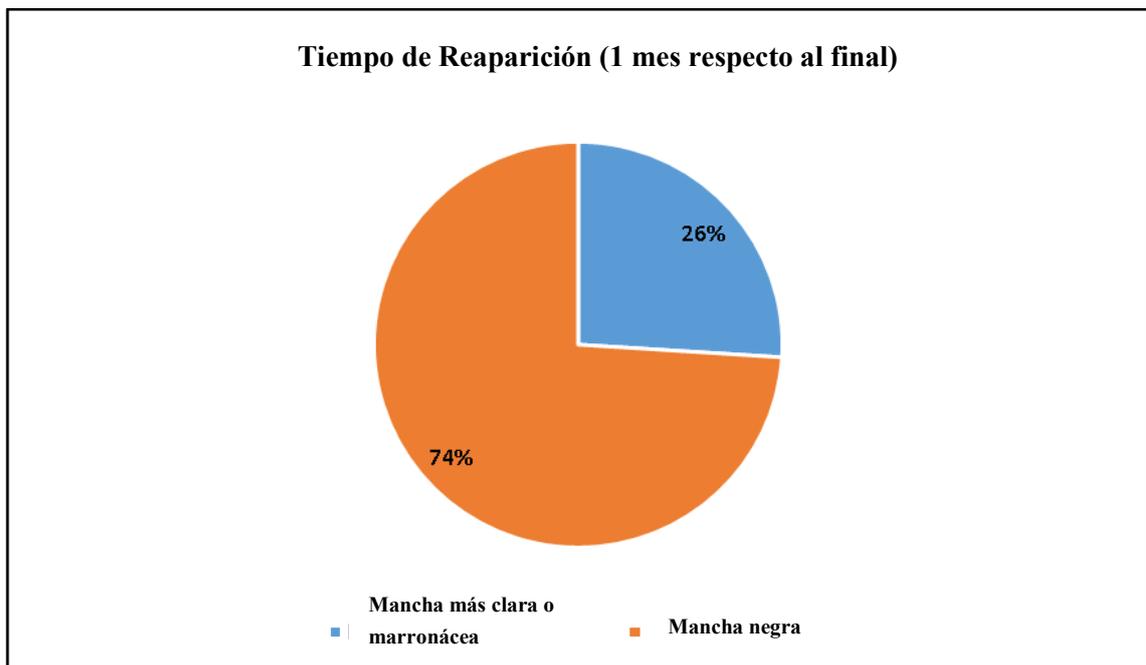


Fig. 29. Cambios producidos en el color entre el primer mes y el último del Tiempo de Reparación.

Observando el mismo proceso pero en el Tiempo de Restauración, se utiliza de nuevo la prueba de McNemar (tabla 14) para realizar las pertinentes comparaciones.

Tiempo de Restauración (+ 1 mes)	Tiempo de Restauración (final)			
	1		2	
	N	% del total	N	% del total
1	0	0,0%	15	48,4%
2	0	0,0%	16	51,6%

Tabla 14. Prueba de McNemar.

Al cotejar los valores de las celdas resaltadas en amarillo, las proporciones son estadísticamente distintas ya que el p-valor es de 0,000 ($p < 0,05$) porque **ningún paciente mejora el color de la pigmentación a lo largo del Tiempo de Restauración (valores 2 a 1) y casi la mitad de los pacientes (48,4%) acaba empeorando (pasa de valor 1 a 2)**. La otra mitad de los pacientes (51,6%) mantiene el color de la pigmentación a lo largo de todo el proceso (fig. 30).

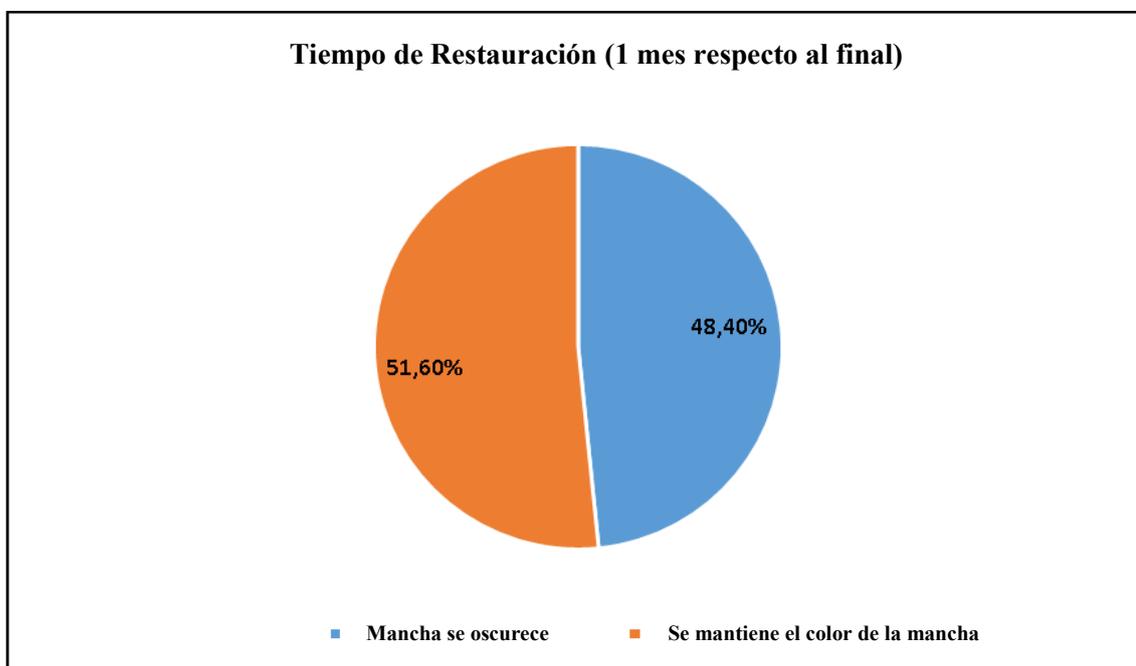


Fig. 30. Cambios producidos en el color entre el primer mes y el último del Tiempo de Restauración.

De forma más concreta, si se tiene en cuenta la coloración de las manchas en el primer mes del Tiempo de Restauración (después de la luz) con relación al primer mes del Tiempo de Reparación (antes de la luz), con el objetivo de comprobar la efectividad de la terapia fotodinámica justo después de su aplicación, se emplea la prueba de McNemar (tabla 15). Esta prueba compara si la proporción de pacientes que han experimentado una mejoría en el color (valores 2 a 1) es la misma que la proporción de pacientes que han experimentado un empeoramiento (valores 1 a 2).

		Tiempo de Restauración + 1 mes			
		1		2	
		Recuento	% del N de la tabla	Recuento	% del N de la tabla
Tiempo de Reparación + 1 mes	1	8	25,8%	0	0,0%
	2	7	22,6%	16	51,6%

Tabla 15. Prueba de McNemar.

Según McNemar, estas proporciones son estadísticamente distintas porque el p-valor es de 0,016 ($p < 0,05$). Este resultado indica que un 22,6% de los pacientes presentan una coloración más clara o marronácea en el primer mes tras la aplicación de la terapia fotodinámica (Tiempo de Restauración) frente al 25,8% después de la profilaxis dental (en el primer mes del Tiempo de Reparación). Es decir, **el color de las pigmentaciones extrínsecas negras es igual de claro o marronáceo en el primer mes tras la profilaxis dental que tras la terapia fotodinámica** (fig. 31).

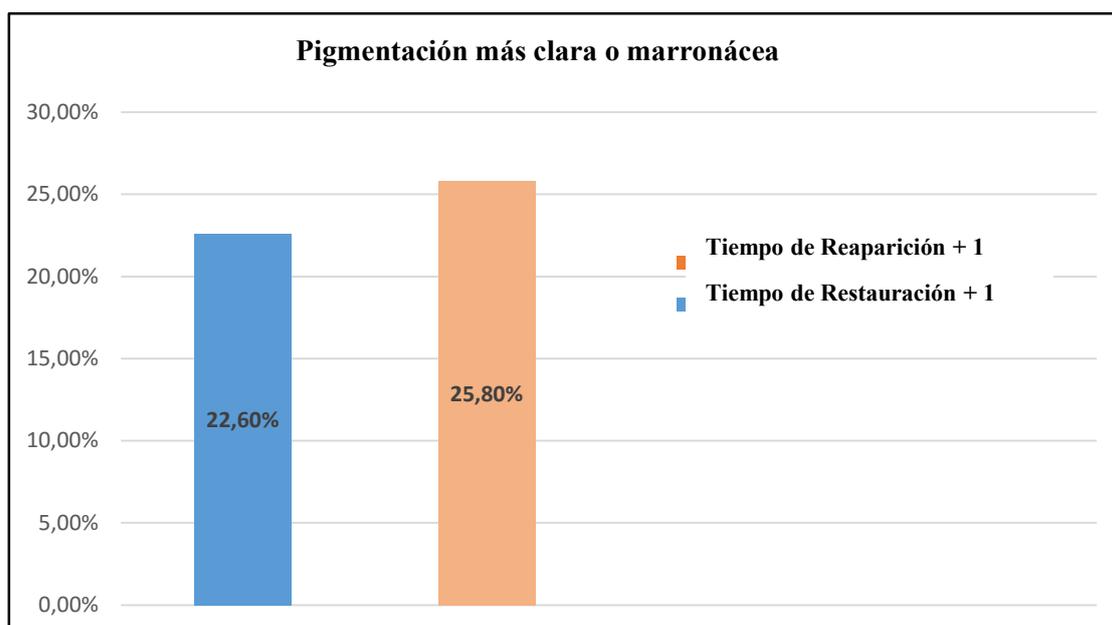


Fig. 31. Porcentaje de pigmentación más clara o marronácea en el primer mes del Tiempo de Reparación (columna naranja) y en el primer mes del Tiempo de Restauración (columna azul).

Por último, si se tiene en cuenta el primer mes tras la terapia fotodinámica (Tiempo de Restauración) en relación al Tiempo de Reparación global, el p-valor según la prueba de McNemar (tabla 16) es de 0,000 ($p < 0,05$).

Tiempo de Reparación	Tiempo de Restauración + 1 mes			
	1		2	
	N	% del total	N	% del total
1	0	0,0%	0	0,0%
2	15	48,4%	16	51,6%

Tabla 16. Prueba de McNemar.

En consecuencia, las proporciones son estadísticamente significativas. Esto quiere decir que, **inmediatamente después de aplicar la terapia fotodinámica, se observa una coloración más clara o marronácea (valor de 2 a 1) en el 48,4% de los pacientes respecto al Tiempo de Reparación, mientras que el 51,6% de los pacientes presentan una coloración negra.** Ningún paciente, sin embargo, empeora el color de la pigmentación (valor 1 a 2) justo tras la aplicación de la luz (fig. 32).

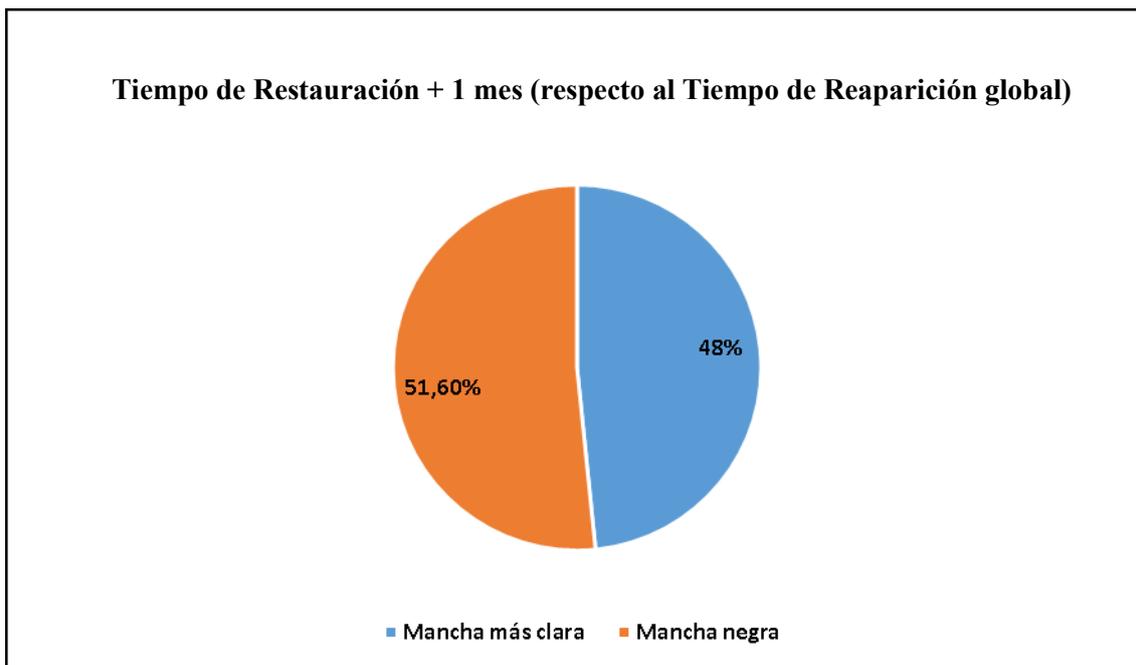


Fig. 32. Porcentaje de pigmentación más clara o marrónácea en el primer mes del Tiempo de Restauración (área azul) y de pigmentación negra (área naranja), comparado con el Tiempo de Reparación.

7.3.4. CAMBIOS EN LA PRESENCIA/AUSENCIA DE BACTERIAS

La placa constituyente de las pigmentaciones extrínsecas negras está formada por un entramado de bacterias muy diverso, entre el que se puede encontrar bacterias pigmentadoras de negro, como *Porphyromonas gingivalis*, y otras tales como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (colonizador primario de la placa por su aerotolerancia) y *Tannerella forsythia* (microorganismo periodontopatógeno igual que *P. gingivalis* y que interactúa con la misma).

La bacteria que está presente en la mayor parte de los pacientes con pigmentaciones extrínsecas negras de la presente tesis doctoral es *T. forsythia* (83,9%), seguido de *P. gingivalis* (29,03%) y de *A. actinomycetemcomitans* (9,7%). El siguiente gráfico (fig. 33) muestra estas proporciones de forma más representativa.

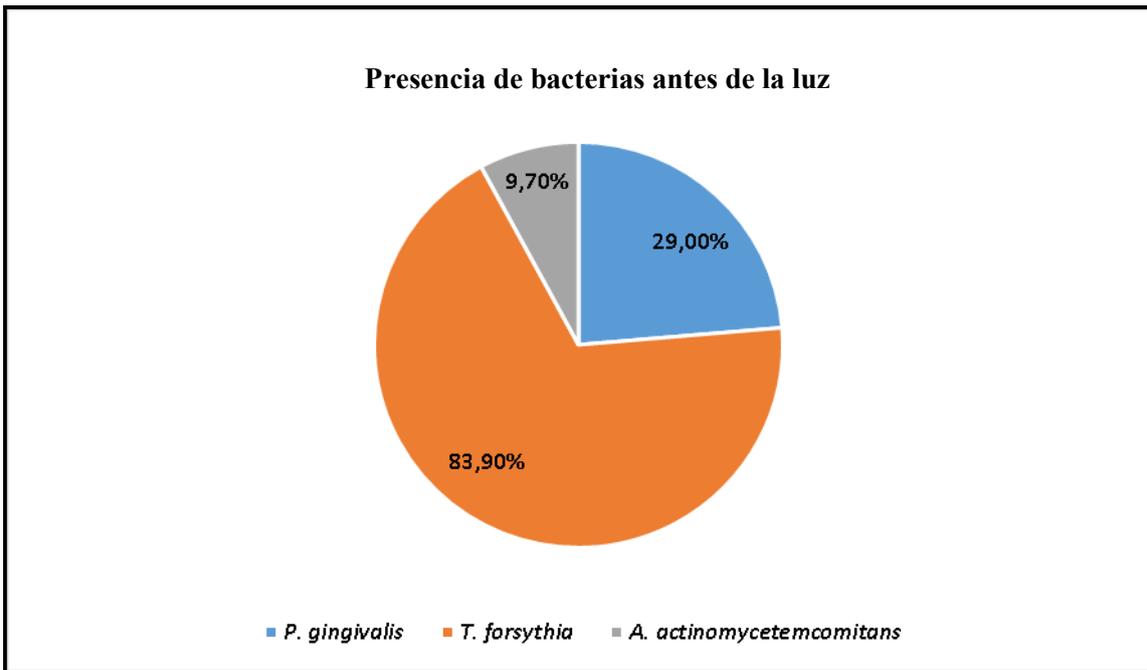


Fig. 33. Porcentaje de *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *A. actinomycetemcomitans* antes de la realización de la terapia fotodinámica.

Después de aplicar a los pacientes la terapia fotodinámica, la proporción en estas bacterias varía solo ligeramente en el caso de *P. gingivalis* (19,4%), mientras que *A. actinomycetemcomitans* (6,5%) y *T. forsythia* (80,6%) exhiben prácticamente los mismos valores. A continuación se muestra un esquema representativo de estos datos (fig. 34).

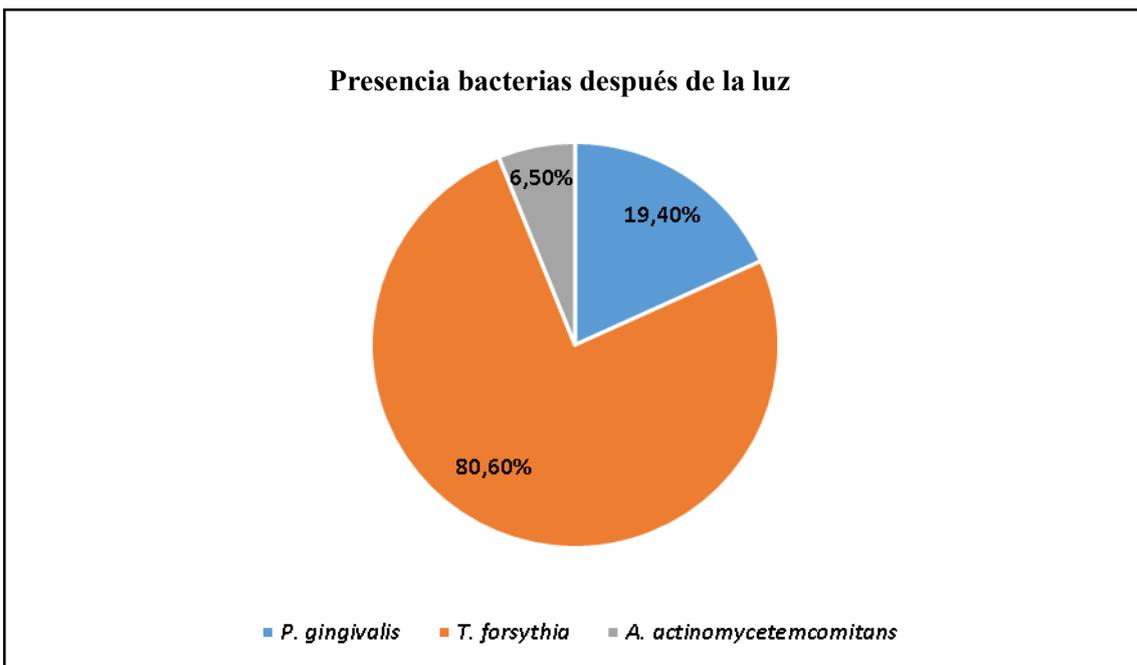


Fig. 34. Porcentaje de *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *A. actinomycetemcomitans* tras la realización de la terapia fotodinámica.

En esta gráfica se exponen simultáneamente los datos de las 3 bacterias antes y después de aplicar la terapia fotodinámica (fig. 35).

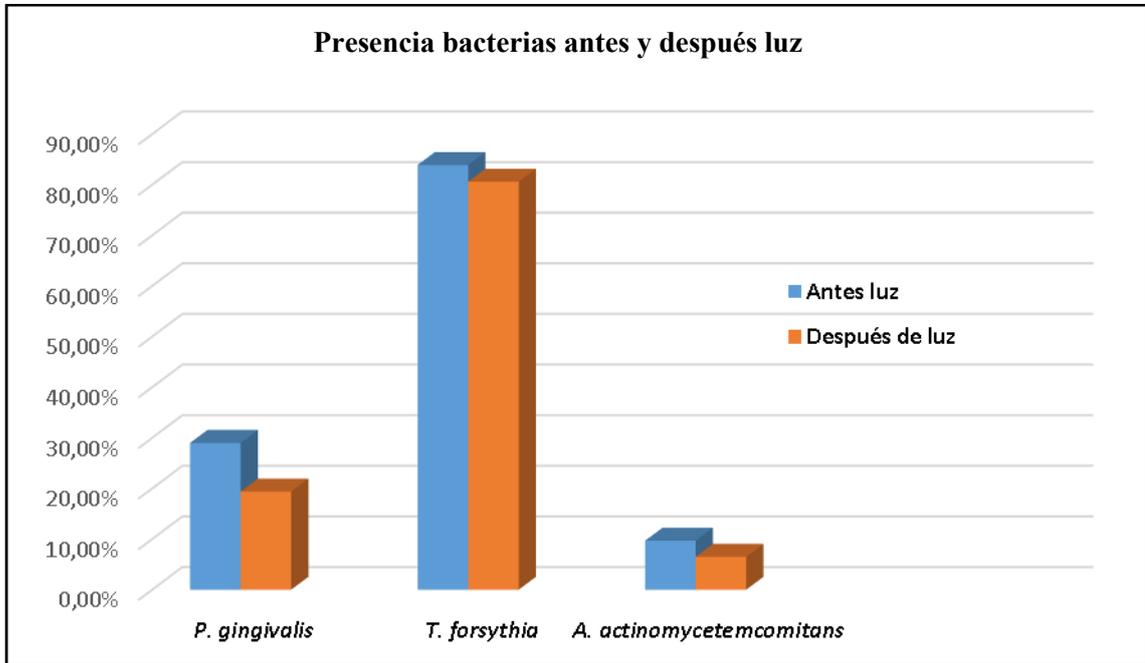


Fig. 35. Porcentaje de *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *A. actinomycetemcomitans* antes (azul) y tras (naranja) la realización de la terapia fotodinámica.

Aplicada la prueba de McNemar (individualmente para cada bacteria) para contrastar el efecto de la aplicación de la luz en la presencia de las 3 bacterias (cotejando las celdas en amarillo), es decir, si la proporción de bacterias en los pacientes es la misma antes de utilizar la terapia fotodinámica que después de ella, se comprueba que las proporciones son iguales para los 3 microorganismos ($p > 0,05$), es decir, **el empleo de la terapia fotodinámica no modifica de forma significativa la presencia/ausencia de bacterias.**

Estas son las pruebas de McNemar para las 3 bacterias y los estadísticos de contraste correspondientes (tablas 17-20).

<i>A. actinomycetemcomitans</i>		
Antes de la luz	Después de la luz	
	NO	SI
NO	28	0
SI	1	2

Tabla 17. Prueba de McNemar para *A. actinomycetemcomitans*.

<i>T. forsythia</i>		
Antes de la luz	Después de la luz	
	NO	SI
NO	3	2
SI	3	23

Tabla 18. Prueba de McNemar para *T. forsythia*.

<i>P. gingivalis</i>		
Antes de la luz	Después de la luz	
	NO	SI
NO	16	6
SI	9	0

Tabla 19. Prueba de McNemar para *P. gingivalis*.

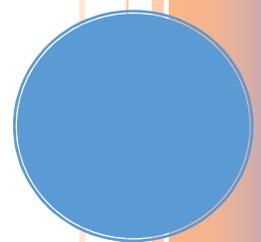
Estadísticos de contraste (Prueba de McNemar)			
	B1A y B1D	B2A y B2D	B3A y B3D
N	31	31	31
p-valor	1,000	1,000	,607

Tabla 20. Estadísticos de contraste para la prueba de McNemar.

7.4. RESULTADOS RESPECTO A LOS EFECTOS ADVERSOS PROVOCADOS POR LA TERAPIA FOTODINÁMICA

De los 31 pacientes pertenecientes a la muestra de nuestro estudio, solo uno afirmó haber experimentado hipersensibilidad dental en los quince días posteriores a la aplicación de la luz. En el resto no hubo evidencia de dolor, irritación intraoral o malestar asociados con el procedimiento.

8. DISCUSIÓN



8. DISCUSIÓN

La gran variedad de tipos de tejidos presentes en la cavidad oral, como la lengua, los dientes y la mucosa, representa un sinfín de lugares disponibles para la colonización de los distintos microorganismos. Sin embargo, hay una serie de factores que son determinantes en esta colonización, como los factores ambientales, la disponibilidad de nutrientes y las características metabólicas de la flora microbiana.

Entre estos microorganismos se hallan las bacterias pigmentadoras de negro, las cuales se asocian con la aparición de una pigmentación extrínseca negra a nivel de las superficies dentales. Aunque estas manchas no suponen *per se* un problema médico para el individuo que las posee, sí que ocasionan un grave problema estético para los pacientes.

Estas tinciones no pueden ser siempre eliminadas en su totalidad mediante una profilaxis dental y, más aún, pueden volver a aparecer pasado un determinado tiempo, con lo cual se deben realizar visitas periódicas al consultorio odontológico.

La terapia fotodinámica constituye en la actualidad una nueva opción terapéutica en diferentes campos de la odontología, especialmente en la enfermedad periodontal. Mediante la acción de la luz y/o el uso de agentes fotosintetizadores, se persigue la eliminación de los microorganismos periodontopatógenos. Se piensa, al mismo tiempo, que algunos de ellos están implicados en la aparición de las pigmentaciones extrínsecas negras, de ahí el “compromiso” de explorar esta opción alternativa de tratamiento a este problema.

8.1. DISCUSIÓN RESPECTO AL MATERIAL Y MÉTODO EMPLEADO

8.1.1. MUESTRA UTILIZADA EN EL ESTUDIO

Debido a la poca prevalencia existente en Valencia de individuos con tinciones extrínsecas negras de origen bacteriano, solo el 2,4%¹¹⁷ y el 7,54% en escolares entre 4-11 años de edad, según Paredes y Paredes¹¹⁸, a las limitaciones absolutas existentes (los menores de 18 años y las embarazadas no podían ser incluidos en la muestra) y al largo período de seguimiento necesario en algunos casos para llevar a cabo el protocolo establecido, el tamaño muestral del que se pudo disponer para esta investigación fue relativamente limitado (31 pacientes).

No hay ningún estudio en Valencia ni en el resto del mundo que indique la prevalencia real de individuos con estas manchas en la población adulta. En el norte de España, concretamente en Oviedo, este rango se sitúa en torno al 3,1%, también en menores de 6 años de edad¹¹⁶. Otras investigaciones con menores en países extranjeros muestran cifras que llegan al 14,8% en Brasil⁷², al 16%² en Filipinas o al 18,5% en Turquía¹¹³. Sin embargo, en los países europeos estas tasas no superan la barrera del 10% (4% en Alemania⁶⁹ y 1,5% también en el país germano para Bartsch⁸⁹).

De la muestra total de 38 pacientes inicial, cinco pacientes se retiraron voluntariamente de la investigación ante la imposibilidad de acudir a las citas establecidas para el control de la pigmentación y dos tuvieron que ser excluidos porque no cumplían con las características necesarias para el estudio y/o incumplieron el protocolo establecido.

En el primero de estos dos últimos casos, mediante el seguimiento mensual del paciente, se pudo confirmar que la pigmentación extrínseca negra que presentaba a nivel de las superficies dentales había ido desapareciendo paulatinamente hasta disiparse por completo sin llegar a aplicársele la terapia fotodinámica. Preguntado entonces por el motivo de aquel cambio, el paciente refirió no haber cambiado en modo alguno los hábitos de cepillado, como tampoco la pasta dental y/o el colutorio empleado, ni haber tomado medicación alguna que pudiese haber influido en la desaparición. En el segundo caso, por otra parte, después de haber sido sometido a la terapia con luz, el paciente comentó al ser cuestionado por el exitoso resultado obtenido que, después del uso de la lámpara empleada en este estudio, había hecho uso de otra lámpara de fotocurado (Bluephase[®], Ivoclar Vivadent S.L.U., España), la cual había aplicado por un tiempo indeterminado de nuevo sobre las superficies dentales. Esto fue posible gracias a la relación laboral de proximidad con un servicio odontológico. Pese a todo, esta paciente fue observada de manera periódica durante unos meses más para comprobar la efectividad del método, siendo necesario un análisis más profundo sobre el tema que puede ser objeto de futuras investigaciones.

8.1.2. INSTRUMENTACIÓN EMPLEADA EN LA INVESTIGACIÓN

8.1.2.1. PARA LA TOMA DE MUESTRAS

Con el fin de no producir daños en el esmalte dental, las muestras de placa bacteriana fueron tomadas con curetas de plástico esterilizables. Recientes estudios revelan la gran cantidad de calcio y fósforo detectados en las muestras de placa dental negra tras el uso de curetas metálicas estándar, cuyo origen se atribuye a la hidroxiapatita del esmalte⁹⁸.

8.1.2.2. PARA LA TERAPIA FOTODINÁMICA

La lámpara GLO Brilliant (GLO™ Science LLC, New York, EEUU) que empleamos en este estudio es una lámpara de blanqueamiento de origen ambulatorio que consta de 15 luces LED y que según los fabricantes cuenta con una longitud de onda de aproximadamente 475 nm (color azul) y una potencia global de alrededor de 3 W. Se pensó en utilizar este dispositivo porque se podía irradiar simultáneamente todas (o casi todas) las superficies bucales de los dientes. Con ello conseguíamos realizar la terapia fotodinámica de una forma relativamente rápida, al no tener que irradiar cada diente de manera individual.

En la literatura encontramos distintas lámparas empleadas en la aplicación de la terapia fotodinámica, con diferentes longitudes de onda y potencia. Desgraciadamente, para poder comparar la eficacia de nuestra lámpara según la potencia empleada con otros estudios respecto al empleo de esta terapia a nivel supragingival sin el empleo de otros coadyuvantes, solo disponemos de un estudio.

Con este propósito, fue creado un dispositivo que irradiaba simultáneamente, sin la ayuda de agentes fotosensibilizadores, premolares y molares en su cara vestibular, así como el margen gingival. Este instrumento constaba de tres luces LED Luxeon III y emitía luz con una longitud de onda entre 415 a 495 nm y una potencia de 70 mW/cm². Después de un período de irradiación de dos minutos diarios durante cuatro días se redujeron significativamente los niveles de *P. gingivalis* y de *P. intermedia* comparado con el lado no irradiado, aunque no así los de *P. nigrescens* y *P. melaninogenica*. Estos autores lo atribuyen al contenido de porfirinas presente en estos microorganismos. Además, no se evidenció dolor, irritación intraoral o malestar asociado con el procedimiento¹⁶.

Nosotros discrepamos con estos resultados, ya que el empleo de la terapia fotodinámica, bajo las condiciones de este estudio, no modifica significativamente los niveles de *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *A. actinomycetemcomitans*.

Se podría pensar que las diferencias pueden radicar en las distintas bacterias estudiadas en ambos casos (solo coincidimos en observar la presencia de *P. gingivalis*) y en el protocolo aplicado. Sin embargo, nuestra intención fue aplicar la luz durante el mismo intervalo de tiempo que estos autores (irradiación de dos minutos diarios dos veces al día durante cuatro días), aunque lo hicimos todo en el mismo día en 2 ciclos de 8 minutos.

Pensamos entonces en comprobar los datos que nos había transmitido la empresa que comercializa el producto. Gracias a la ayuda del departamento de Comunicaciones Ópticas de la Universidad de Valencia, dispusimos de un colorímetro Chroma Meter CL-200[®] (Konica Minolta Sensing, Inc.; Tokyo, Japan) con el cual pudimos verificar la densidad de iluminancia medida en lux (fig. 36), resultando ser de 151 Lux. Sabiendo que la irradiancia necesaria para producir 1 Lux a 555 nm (color verde) es de 1,464 mW/m² (valor fijo) y que nuestro dispositivo tiene una superficie aproximada de 10 cm², calculamos que la lámpara tenía una potencia de 0,02583 mW/cm² (anexo B). Por tanto, la potencia global de la lámpara sería de 0,0002583 W, una cifra mucho menor a la indicada por la empresa distribuidora y que puede haber influido en el resultado de nuestras investigaciones, al no conseguir la mortalidad bacteriana deseada. El dispositivo empleado tenía una potencia de 70 mW/cm², una diferencia considerable si lo comparamos con los datos de nuestra lámpara¹⁶.



Fig. 36. Comprobación de la irradiancia del dispositivo GLO Brilliant (fuente: autor).

8.1.2.3. SISTEMA PARA EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LA PIGMENTACIÓN EXTRÍNSECA NEGRA

Los criterios para el diagnóstico de la pigmentación extrínseca negra no están bien definidos⁷³. Con el paso del tiempo, las distintas clasificaciones han ido evolucionando, siendo la más empleada en los recientes estudios la que sigue el sistema elaborado por Gasparetto, que engloba los criterios de Shourie y Koch⁷². Según esta clasificación, los dientes con pigmentación extrínseca negra pueden recibir distintas puntuaciones:

- Puntuación 1: puntos pigmentados o líneas incompletas paralelas al margen gingival.
- Puntuación 2: líneas continuas pigmentadas, fácilmente observables y limitadas a la mitad del tercio cervical de la superficie dental.
- Puntuación 3: pigmentación que se extiende más allá del tercio cervical.

Sin embargo, esta clasificación no abarca en modo alguno la diversidad de apariencias que exhiben los dientes con estas manchas y la puntuación en algunas piezas dentales puede ser objeto de confusión por parte del observador.

En concreto, la superficie oclusal no se ve representada en estos criterios, cuando muchos dientes posteriores, sobretodo molares, muestran una gran cantidad de pigmentación en esta área. Respecto a las superficies interproximales, es posible hallar dientes que muestran solo pigmentación en estas localizaciones sin tener ningún punto o línea paralelo al margen gingival en vestibular/lingual. Ambos casos no son contemplados según estos criterios.

Otra peculiaridad que es importante destacar es que, en aquellos dientes que no presentan pigmentación a nivel cervical, y solo tienen un par de puntos pigmentados sueltos a nivel incisal/oclusal, les correspondería una puntuación de 3. De la misma manera, un diente con gran cantidad de pigmentación, tanto a nivel cervical como incisal/oclusal, obtendría también la máxima puntuación, tratándose de casos totalmente diferentes.

Por todo ello, creemos conveniente proponer una nueva clasificación que pueda suplir las carencias y/o errores de la empleada hasta ahora. Este nuevo sistema (fig. 37) comprendería las siguientes puntuaciones con sus correspondientes subescalas:

- Puntuación 1: puntos pigmentados o líneas incompletas.
 - a) paralelos al margen gingival.
 - b) paralelos al margen gingival y/o más allá del tercio cervical.
 - c) solo en zonas interproximales.
- Puntuación 2: líneas continuas pigmentadas, fácilmente observables y limitadas a la mitad del tercio cervical de la superficie dental.
- Puntuación 3: líneas continuas pigmentadas que se extienden más allá del tercio cervical.
- Puntuación 4: líneas continuas pigmentadas que se extienden más allá del tercio cervical y cara oclusal pigmentada.

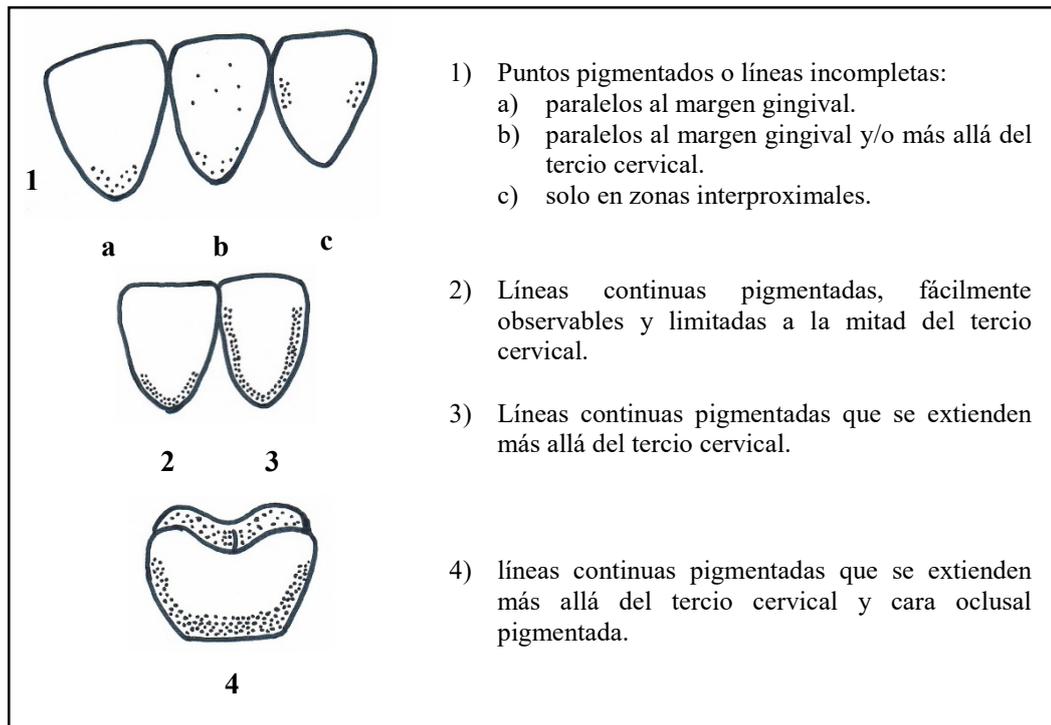


Fig. 37. Nueva clasificación de las pigmentaciones extrínsecas negras de origen bacteriano propuesta en la presente tesis (fuente: autor).

8.1.3. METODOLOGÍA EMPLEADA EN LA TERAPIA FOTODINÁMICA

El tratamiento de elección de la pigmentación extrínseca negra de origen bacteriano en la actualidad son las profilaxis dentales, existiendo gran variabilidad interindividual en cuanto a la frecuencia de las mismas, ya que depende del tiempo que tarda la pigmentación en volver a aparecer en boca^{63,66,118}. No obstante, este tratamiento no está exento de perjuicios, no solo psicológicos por la imagen antiestética para el portador, sino también físicos a nivel de la estructura del esmalte.

La eliminación de las manchas mediante el uso del ultrasonido demuestra que existe un riesgo excesivo de provocar un severo daño al esmalte cuando es empleado *in vitro*, sobre todo cuando se utiliza la punta del instrumento en lugar del lateral (hasta cuatro veces más). Además, lógicamente la profundidad del defecto es significativamente mayor cuanto más dura en el tiempo esta acción. Por ello, es esencial utilizar el lateral de la punta de ultrasonidos y hacerlo con constantes movimientos sobre la superficie del diente¹⁷⁶. Con la oscilación de la punta cabe la posibilidad, advierten Paramashivaiah y Prabhuji¹⁷⁷, que el diente actúe como un vehículo conduciendo la energía de la vibración desde la punta hacia el ápice radicular, lo que resultaría en un daño potencial a diferentes estructuras como los vasos sanguíneos que se hallan alrededor del diente.

Si esta remoción se lleva a cabo con curetas metálicas, el odontólogo debe ser consciente de que esta metodología implica la sustracción de la capa externa de hidroxiapatita del esmalte, por lo que debe ser llevada a cabo con precaución⁹⁷.

El manejo del espray de bicarbonato *in vitro* causa desgaste y una reducción en la microdureza de la superficie del esmalte, aunque la saliva permite la recuperación de las condiciones iniciales de microdureza y reduce el desgaste una hora después, alcanzando la máxima reparación a las 24 horas¹⁷⁸. Asimismo, este efecto es más evidente sobre el esmalte desmineralizado que sobre el esmalte sano¹⁷⁹. De acuerdo con estos últimos autores, Goebel y Jost-Brinkmann¹⁸⁰ apuntan que es dudoso señalar que este método o el uso de pastas profilácticas sean el causante de la aparición de pigmentaciones dentales porque no se observan cambios significativos en la tensión superficial del esmalte *in vitro* tras su empleo, sería más bien debido a características inherentes de cada sujeto.

En consecuencia, por la alta probabilidad de causar lesiones a nivel pulpar y/o a nivel de la superficie del esmalte en forma de defectos que conllevarían una mayor proporción de lesiones donde se pudiesen asentar las bacterias pigmentadoras de negro produciendo más manchas, se propuso en la siguiente tesis la utilización de una terapia alternativa como la fotodinámica.

8.1.3.1. PROTOCOLO DE USO DE LA LÁMPARA

Los tejidos duros del diente pueden ejercer un efecto protector para el tejido pulpar frente a cualquier estímulo nocivo que provenga del exterior, incluyendo el daño originado por los cambios de temperatura. Sin embargo, se desconoce hasta qué punto la pulpa puede tolerar este “daño térmico”.

Bajo las mismas condiciones de la presente tesis, se evaluó la sensibilidad pulpar en humanos *in vivo*. Para ello se empleó un láser Nd:YAG durante 30 segundos a 50 J/cm^2 , 2 mm por debajo de la línea mucogingival (sin llegar a establecer contacto) en el canino mandibular derecho. En todos los individuos el umbral de dolor ($58,8 \pm 7,30^\circ\text{C}$) aumentó después de la irradiación, posiblemente porque se produjo una afectación de las fibras nerviosas (es decir, los pacientes se volvieron menos tolerantes al dolor). Los valores, sin embargo, volvieron a la normalidad una semana después del tratamiento¹⁸¹.

En nuestro caso, con el propósito de evitar una lesión pulpar por el aumento de temperatura de la luz LED utilizamos dos dispositivos idénticos, uno para cada ciclo de 8 minutos. Asimismo, con un termómetro digital con pantalla LCD comprobamos el aumento de temperatura oral cuando la lámpara se encontraba situada dentro de la boca, para reproducir al máximo las condiciones del estudio (fig. 38). Durante los 8 minutos se produjo un incremento de la temperatura de $2,6^\circ\text{C}$ (tabla 21).



Fig. 38. Termómetro digital con pantalla LCD (el aplico metálico fue insertado en el interior de la cavidad oral junto con el dispositivo lumínico) (fuente: autor).

Minutos	Temperatura (°C)
1	36,4
2	37,1
3	37,3
4	37,9
5	38,0
6	38,4
7	38,8
8	39,0

Tabla 21. Cambio de temperatura experimentado por el dispositivo lumínico en cada ciclo.

En consecuencia, y a pesar que uno de los pacientes de la muestra afirmó haber tenido hipersensibilidad durante los 15 días posteriores al procedimiento, creemos que sería más bien debido a características individuales que a un posible daño pulpar provocado por la aplicación de la lámpara. El dispositivo empleado en este estudio no sobrepasó en modo alguno los 40°C, quedando muy de lejos de las cifras comentadas durante las cuales habría afectación de las fibras nerviosas pulpares ($58,8 \pm 7,30^\circ\text{C}$)¹⁸¹. Además hay que tener en cuenta que el período de aplicación utilizado en este estudio fue mucho mayor al expuesto por estos autores, de ahí el empleo de dos dispositivos distintos para evitar un posible sobrecalentamiento.

8.2. DISCUSIÓN RESPECTO A LOS CAMBIOS PRODUCIDOS EN LAS PIGMENTACIONES TRAS LA TERAPIA FOTODINÁMICA

8.2.1. CAMBIOS EN EL TIEMPO, CANTIDAD Y COLOR

Exceptuando la presente tesis, ningún estudio ha observado el “comportamiento” de las pigmentaciones extrínsecas negras, es decir, su evolución en el tiempo, como tampoco la gran variabilidad interindividual que existe de unos sujetos a otros.

A medida que hemos ido avanzando en la investigación, hemos podido averiguar algunas curiosidades al respecto de esta entidad. Al indagar en las relaciones familiares de los voluntarios, se observa una correlación en la transmisión de las manchas entre miembros de una misma familia (datos no disponibles), aunque no se ha podido comprobar estadísticamente. O sea, las bacterias pigmentadoras de negro se transferirían de padres a hijos, hermanos a hermanas o incluso entre esposos. Todos estos casos están bien documentados en la literatura^{10,34,40,45}.

La cantidad de pigmentación extrínseca negra difiere mucho de unos pacientes a otros, sin parecer que ello dependa de la inflamación gingival existente y, en consecuencia, del sangrado gingival.

Lo más lógico sería pensar que, a peores condiciones gingivales y/o periodontales existentes, mayor sería el crecimiento experimentado por las bacterias pigmentadoras de negro (y con ello más pigmentación) al disponer de una mayor cantidad de nutrientes y por las características ambientales^{68,117}.

Contrariamente a la hipótesis de partida, hemos podido constatar que individuos con buena salud gingival y una correcta higiene oral presentaban abundante pigmentación negra (en ambas caras vestibulares y palatinas/linguales) y que en individuos jóvenes con malas condiciones orales (incluso a nivel periodontal) la cantidad de manchas era bastante menor. Nuestras observaciones estarían de acuerdo con otros estudios publicados^{63,113,116,119,120}.

Otro dato interesante que nos refirieron los pacientes es la alteración sufrida en las pigmentaciones a consecuencia de los cambios hormonales, ocurridos en situaciones tales como el embarazo. Una paciente nos refirió haber contraído las pigmentaciones durante el mismo sin que hubiera precedentes anteriores en la familia, mientras que otra admitió que tras el embarazo las manchas disminuyeron en su cuantía. En este caso, sí que podríamos atribuirlo al aumento de las bacterias pigmentadoras de negro que se puede producir por las variaciones en la microbiota a nivel subgingival que provocan las hormonas sexuales. Al mismo tiempo, hay un cambio en la respuesta inflamatoria a nivel del huésped que participaría indirectamente de estas alteraciones gingivales¹⁸². En correlación con estos datos, tuvimos también la posibilidad de observar la evolución de las manchas en una paciente con síndrome de Down. Esta paciente presentaba pigmentación a nivel de todas las superficies dentales, incluso caras oclusales, demostrando la “agresividad” de la acción bacteriana. En la literatura se revelan mayores cifras de *A. actinomycetemcomitans* y de *P. gingivalis* en sujetos afectados de “trisomía del 21”, quizá debido al compromiso inmune existente que facilitaría la inflamación gingival y el inicio de la periodontitis¹⁸³.

Un aspecto a tener en cuenta es la posibilidad de transmisión de la pigmentación a través de material contaminado. Un paciente refirió que las manchas aparecieron tras la realización de una profilaxis dental, tras lo cual habría que valorar la eventualidad de tal suceso, aunque tampoco se puede descartar la formación de mayores recodos en las superficies dentales después del uso de ultrasonidos que ayudasen a crear unas condiciones favorables para el desarrollo de las bacterias pigmentadoras de negro.

No obstante, este caso no fue el único, ya que otra paciente comentó que, tras una estancia de larga duración en un centro hospitalario con intubación oral, estas manchas aparecieron por primera vez en la cavidad oral. Se ha comprobado la transmisión de patógenos respiratorios (como *S. aureus*), tras la intubación orotraqueal¹⁸⁴, aunque no deberíamos descartar el empeoramiento de las condiciones de higiene orales durante este período que facilitasen que estos microorganismos desarrollaran la pigmentación.

También es importante exponer la potencial influencia que la acción de determinados fármacos, como los antibióticos, pueden producir a nivel de las manchas, de ahí que fuera uno de nuestros criterios de exclusión. En un estudio se demostró *in vivo* la acción bactericida del metronidazol, solo o en combinación con espiramicina en pacientes con periodontitis. Mientras que a los 6 días de la administración de ambos fármacos se consiguen eliminar todas las especies evaluadas (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *Micromonas micros*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus*) excepto *A. actinomycetemcomitans*, una cepa de *Capnocytophaga* spp. y *Fusobacterium nucleatum*, el empleo solo del metronidazol actúa contra las especies anteriormente indicadas, salvo contra *Capnocytophaga* spp., *E. corrodens* y *P. intermedia*¹⁸⁵. Por tanto, los resultados se podrían haber visto alterados tras la ingesta de medicamentos por alguno de los sujetos voluntarios, ya que habría sido posible que se produjesen modificaciones en la población de las bacterias pigmentadoras de negro, entre otros.

Durante el tiempo que nosotros denominamos de Reparación (después de la profilaxis normal, antes de aplicar la luz), solo el 26% de los pacientes mostró una coloración más clara (marronácea, negra/marrón) en las pigmentaciones en los meses inmediatamente posteriores a la profilaxis. Sin embargo, a medida que pasó el tiempo, la pigmentación se tornó negra. El mecanismo de producción del pigmento, aunque no es concluyente¹⁰², estaría relacionado con la descomposición de las moléculas de hemoglobina y transferrina por parte de las bacterias¹¹². Se podría comparar, por consiguiente, con una necrosis pulpar debida a un traumatismo dental, en el cual la extravasación de la sangre y la posterior degradación de la hemoglobina provocan la tinción intrínseca dental.

En este caso, la tinción se quedaría a nivel supragingival, como si dentro del entramado que forma esta placa negra las moléculas de hemoglobina y transferrina quedasen “atrapadas”, dando lugar a la característica apariencia de esta pigmentación.

La media de tiempo que tardaron las manchas en aparecer en este período (Tiempo de Reparación) fue de 5,2 meses. Concretando, para algunos pacientes este tiempo fue tan solo de 3 meses, aunque como máximo tuvimos un paciente con un tiempo de 13 meses. En todos los casos, observamos que estas diferencias interindividuales no correspondieron en modo alguno a los hábitos de higiene oral de los propios individuos y/o, por consiguiente, al estado de salud oral. De igual manera, podemos ratificarnos en nuestras afirmaciones en cuanto a la cantidad de la pigmentación.

La presente tesis doctoral se ideó y diseñó de una forma “experimental”, al no existir cuando se planteó la misma, estudios llevados a cabo sobre la terapia fotodinámica aplicada a las pigmentaciones extrínsecas negras. Debido al pequeño tamaño muestral que teníamos (a causa de la baja prevalencia de la pigmentación en nuestra región) no se pudieron adjudicar distintos protocolos para que el resultado del análisis estadístico fuese lo más extrapolable posible a la situación real.

Con el objetivo de poder comparar nuestros resultados, sin embargo, se publicó recientemente un relato de un caso, donde estos autores también estudiaron el efecto de la aplicación de la luz sobre las tinciones negras, aunque con distinto protocolo al nuestro⁸⁰.

Según la metodología que empleamos, para nosotros la terapia fotodinámica no altera el intervalo de tiempo en el cual aparecen de forma natural las pigmentaciones extrínsecas negras, es decir, el Tiempo de Reparación es el mismo que el Tiempo de Restauración. No obstante, durante el primer mes tras la aplicación de la luz, este tratamiento es beneficioso para el 64,5% de los pacientes, puesto que muestran menor cantidad de pigmentación que la alcanzada en el primer mes tras la profilaxis dental (en el Tiempo de Reparación). Lo que ocurre posteriormente es que, a medida que pasa el tiempo, los pacientes tienden a mostrar mayor o igual cantidad de pigmentación. Respecto al color de la pigmentación, no hay diferencias significativas entre ambos tiempos, de Reparación y de Restauración.

Ahondando en los casos de una forma más individual, cabe decir que no creemos que el efecto de la terapia estuviese influido por cambios en hábitos de higiene o en el empleo de distintas pastas dentífricas o colutorios, uso de medicamentos, etc..., ya que todos los sujetos fueron cuestionados en ese aspecto durante las visitas de control.

Unos autores aplicaron de forma exitosa esta terapia sobre las pigmentaciones extrínsecas negras en un sujeto de 10 años al cual siguieron durante 7 meses. Ellos emplearon, sin embargo, un agente fotosensitizador, el azul de toluidina, junto con un láser de diodos aluminio-galio-indio-fósforo de 660 nm a 70 J/cm² durante 23 segundos en 5 sesiones (1 a la semana en un período de 5 semanas), de acuerdo al área irradiada: 1) dientes anteriores mandibulares, 2) dientes posteriores mandibulares, 3) dientes anteriores maxilares, 4) dientes posteriores maxilares, 5) todas las superficies dentales. El láser se usó en ambas caras, vestibular y palatina, de todos los dientes. Cada vez que se terminaba una sesión, las pigmentaciones negras extrínsecas que aún permanecían adheridas se eliminaron con curetas Gracey⁸⁰.

Como efectos colaterales se describe desmineralización del esmalte dental acompañado de hipersensibilidad dental postoperatoria, que fueron solucionados con la administración de una solución de fluoruro de sodio.

Esta reciente investigación contradice nuestros resultados porque nosotros no conseguimos la eliminación completa de las pigmentaciones extrínsecas negras. Las posibles causas de ello podrían estribar en el protocolo empleado, principalmente. Como hemos comentado anteriormente, decidimos no utilizar diversos protocolos para que nuestros resultados estadísticos fuesen fiables. Por eso, solo fue aplicada una vez la terapia fotodinámica a lo largo de la investigación, lo cual no provocó probablemente la mortalidad bacteriana deseada de las bacterias responsables de la pigmentación. Se necesitarían de futuros estudios para establecer un protocolo adecuado.

Otro aspecto importante sería la baja potencia de nuestro dispositivo lumínico para lograr este objetivo. En este caso⁸⁰ se empleó un láser a 70 J/cm^2 , y nuestra lámpara emitía con una potencia de $0,02479 \text{ J/cm}^2$, cifra mucho menor que haría que no fuese efectiva para esta terapia. Aparte de ello, por el diseño de la lámpara, ésta solo fue aplicada en las caras vestibulares de los dientes. Debido a que la luz va perdiendo potencia a medida que se va dispersando por los tejidos¹⁵², es factible pensar que no alcanzase la cara lingual/palatina de los dientes, que en la mayoría de los pacientes presenta mayor cantidad de pigmentación, sobre todo a nivel de molares (quizá porque la lengua constituye un reservorio para las bacterias pigmentadoras de negro, lo que facilitaría la colonización de las áreas dentales cercanas)¹⁵³.

No consideramos conveniente el empleo de un agente fotosensitizador, ya que se logra una reducción de los microorganismos pigmentadores de negro *P. gingivalis* y *P. intermedia* solo con la utilización de una lámpara LED a 455 nm y 70 mW/cm^2 ¹⁶.

Por otra parte, tras el tratamiento solo un paciente nos refirió hipersensibilidad, lo cual creemos que es más posible que fuese debido a causas propias del individuo, ya que el resto no sintió molestia alguna. En este caso discrepamos totalmente con estos autores⁸⁰, puesto que los efectos colaterales que obtuvieron serían por la excesiva potencia aplicada. Además, teniendo en cuenta que se trataba de un menor de edad podrían habersele provocado más perjuicios que beneficios. La luz junto con la limpieza con curetas no solo consiguió eliminar aparentemente la pigmentación, sino que también elevó la temperatura pulpar en el momento de su aplicación, pudiendo alterar las respuestas de vitalidad en dientes jóvenes. Aparte, se provocó una desmineralización dental, lo que nos hace corroborar nuestras aseveraciones en cuanto a la potencia de la luz. Aunque solucionado este efecto adverso con flúor, cabría estudiar si la estructura microscópica del esmalte no se ha quedado de alguna manera afectada. Asimismo, se tendría que estudiar el cambio ocasionado en la comunidad microbiana con el paso de los años.

Analizando el método seguido por estos autores, nos parece cuanto más curioso y, por tanto, creemos que son necesarias más investigaciones al respecto, la “fácil” eliminación de la pigmentación tras el empleo del láser. Considerando que se hubiese alcanzado la completa mortalidad de los microorganismos responsables de la pigmentación, hay que tener en cuenta que se trata de un tipo de placa con las mismas características que las que muestra un individuo sin manchas.

La remoción de la placa “normal” ya adherida se realiza por medio del uso de ultrasonidos durante una profilaxis profesional en consulta, y esta placa es, si cabe, bastante más difícil de remover, a menos que la luz hubiese actuado “cortando” la placa, separándola del esmalte, como se haría durante la escisión de lesiones cariosas con láser, lo que explicaría la desmineralización del tejido adamantino en determinados puntos y la remoción de las pigmentaciones “por partes”, es decir, en las distintas áreas de actuación (las bacterias causantes de las manchas forman parte de una comunidad microbiana que se encuentra repartida por toda la cavidad oral, no solamente están en una única localización).

Lo que sí que hallamos totalmente inadecuado es la remoción de las pigmentaciones restantes tras cada sesión con curetas Gracey porque, al mismo tiempo, se produce la eliminación de hidroxiapatita del esmalte⁹⁷. Esta metodología resulta mucho más agresiva que la aplicada por nosotros, ya que nos limitamos a prácticas no mecánicas y no dañinas para las estructuras orales duras.

No hay que olvidar, empero, la desaparición de la pigmentación de forma espontánea en individuos jóvenes que alcanzan la pubertad sin que se lleguen a conocer de verdad los motivos del caso⁶⁶.

En cualquier caso, pensamos que es necesario que se introduzcan nuevas líneas de investigación en este campo que ayuden a dilucidar el mejor mecanismo para eliminar esta pigmentación. Quizá en un futuro no muy lejano a esta población de individuos afectados por las manchas se le pueda ofrecer un tratamiento alternativo que obvie las profilaxis de repetición y ayude a mejorar su autoestima.

8.2.2. CAMBIOS PRODUCIDOS EN LA PRESENCIA/AUSENCIA DE BACTERIAS ANTES Y TRAS LA TERAPIA FOTODINÁMICA

Tal y como apuntaban los primeros estudios sobre la composición química y bacteriana de las pigmentaciones extrínsecas negras, la composición de la placa dental negra presenta muchas similitudes con la placa bacteriana normal. En su estructura bien diferenciada se observan 2 capas, una externa, con numerosos microorganismos filamentosos dispuestos de forma perpendicular a la superficie del esmalte, con aspecto de placa madura. En la interna se aprecia mejor la coloración del depósito, entre amarillo a marrón, también con multitud de microorganismos filamentosos dispuestos de igual modo de forma perpendicular a la superficie del diente⁷⁷. Mediante el microscopio de transmisión de electrones, Theilade y Pang⁷⁵ pudieron concretar que se aprecian mayormente en estas tinciones cadenas de bacterias gram-positivas y filamentos gram-positivos.

Con el paso de los años, gracias a la evolución de la tecnología, se ha podido averiguar la “identidad” de estos microorganismos constituyentes de la placa dental negra, aunque sigue sin saberse con certeza cuál o cuáles son los responsables directos de tan característica pigmentación, aunque bien podrían ser una combinación de ellos.

En general, es menor la variabilidad en la comunidad microbiana en niños con manchas negras, tanto a nivel de las mismas como en la saliva⁸⁴. Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se halla que la bacteria *A. actinomycetemcomitans* está implicada en el 70% de los casos, por lo cual se considera responsable de la pigmentación⁸². Estos resultados no coinciden con los resultados de la presente tesis, puesto que este microorganismo solo estaba presente en el 9,7% de los casos. Otros autores tampoco encuentran cifras importantes en el recuento de *A. actinomycetemcomitans*, al cual consideran responsable en parte del depósito de la tinción^{81,84,89}.

Entre otras especies pigmentadoras analizadas en la tinción extrínseca negra, los niveles de *P. intermedia* y *P. nigrescens* no son significativos^{81,84,89}. Sin embargo, en otro estudio, la bacteria más frecuentemente observada en sujetos con manchas es *P. nigrescens* (30,7%), seguido de *P. intermedia* (3,8%)⁷⁹.

Con respecto al caso de *P. gingivalis*, este microorganismo fue detectado en el 29,03% de los pacientes de nuestro estudio. Una cantidad similar (34%) es la que reportan en un estudio⁸¹, en este caso casi el doble de individuos con respecto al grupo control (17%). Por el contrario, otros autores no encuentran esta bacteria⁸², mientras que pequeños son los porcentajes encontrados para *Porphyromonas* spp. (0,97%) por García⁸³.

Aparte de estas bacterias, al mismo tiempo se ha podido constatar la presencia de *S. mutans*, aunque sus niveles no son de especial relevancia⁷⁹. Además, hay *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *Lactobacillus* spp., *S. sobrinus*, *A. oris*, *V. párvula*, *S. sanguinis*, *Cardiobacterium* spp., *Haemophilus* spp., *Corynebacterium* spp. y *Treponema* spp^{81,83}. De igual modo que en nuestros resultados, *Tannerella* spp. es detectada con una gran prevalencia en pacientes portadores de las manchas⁸⁴.

El único estudio realizado en la actualidad que compara la presencia bacteriana en las pigmentaciones extrínsecas negras antes y después de la realización de la terapia fotodinámica, halla que todos los microorganismos evaluados (*A. actinomycetemcomitans*, *P. melaninogenica*, *P. nigrescens*, *P. gingivalis* y *P. intermedia*) ven reducidos sus niveles drásticamente (64% vs. 22% de forma global) a los 3 meses tras el tratamiento, incluso llegando a desaparecer en el último caso⁸⁰.

No obstante, hay que tener en cuenta que estos autores emplean como agente fotosensibilizador una solución de azul de toluidina. Esto contradice los resultados de nuestra investigación, ya que solo la proporción de *P. gingivalis* varía ligeramente (29% vs. 19,4%), mientras que las tasas de *A. actinomycetemcomitans* y de *T. forsythia* no son muy diferentes (9,7% vs. 6,5% y 83,9% vs. 80,6%). Cabría apuntar la posibilidad que esto podría ser debido al éxito en el protocolo aplicado.

En el caso mencionado⁸⁰, las muestras fueron tomadas a los 3 meses tras la primera aplicación de la terapia fotodinámica, mientras que nosotros las tomamos una vez las pigmentaciones extrínsecas negras volvieron a adquirir la misma apariencia que mostraron antes del tratamiento o cuando este proceso se estabilizó, sin llegar a recuperar el mismo aspecto que tenían antes de la misma. Por otra parte, los menores de edad y embarazadas se hallaban entre los criterios de exclusión de nuestro estudio, tal y como aprobó el Comité de Ética de la Universidad CEU-Cardenal Herrera.

Esto se hizo por la sencilla razón de no alterar la microbiota existente en menores ya que, a pesar que los niveles de *S. mutans* en individuos con pigmentaciones extrínsecas negras no son esencialmente distintos de los de una persona sin manchas⁷⁹, sí que parece claro el efecto protector que ejercerían estas manchas frente a la caries dental^{70,120,123}, posiblemente por una menor adherencia de estos microorganismos a la superficie dental o por el aumento en el número de *Actinomyces spp*⁸⁹.

Las bacterias relacionadas con esta pigmentación podrían contribuir a crear un ambiente no favorable para las bacterias implicadas en el desarrollo de la caries dental, reduciendo su potencial cariógeno en consecuencia¹²⁶. Así, las interacciones metabólicas de cooperación entre las especies harían que *F. nucleatum* generase ácidos orgánicos y amoniaco, que ayudaría a crear un pH más neutro evitando caídas bruscas del mismo en presencia de carbohidratos fermentables y bacterias acidófilas, como el *S. mutans*. Como resultado, *P. gingivalis* estaría protegida frente al ataque ácido¹⁶⁷. A la vez, *F. nucleatum* favorecería el crecimiento de *P. gingivalis* gracias a su capacidad de sobrevivir en ambientes parcialmente oxigenados dentro del *biofilm*.

Para *F. nucleatum* no es condición indispensable la presencia de dióxido de carbono para su crecimiento, pero para *P. gingivalis* sí. Entonces, el primero satisfaría las necesidades del segundo, permitiendo su crecimiento a nivel de la placa supragingival, como en el caso de las pigmentaciones extrínsecas negras¹⁶⁹.

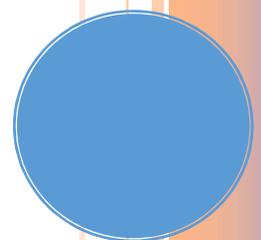
Refiriéndonos a lo anteriormente expuesto, el delicado equilibrio existente en la microbiota oral podría verse alterado con la aplicación de la terapia fotodinámica y los perjuicios provocados podrían ser mayores a los beneficios obtenidos con la terapia.

Otros motivos por los cuales pueden existir tantas diferencias en la población microbiana que compone las tinciones extrínsecas negras podrían deberse a otros factores tales como la raza, la genética, la dieta, la localización geográfica donde se lleven a cabo los estudios al respecto, etc.

Por otra parte, se apunta que, gracias al éxito de la terapia fotodinámica, se produjo una disminución de la inflamación gingival, caracterizada por un enrojecimiento del margen gingival y sangrado al sondaje. Ellos afirman que el desarrollo de las bacterias pigmentadoras de negro y las consiguientes pigmentaciones sería debido a la potencial fuente de nutrientes que constituye el líquido crevicular gingival⁸⁰.

Sin embargo, consideramos que este tema necesita de futuras investigaciones porque no todos los individuos con inflamación gingival desarrollan pigmentaciones o a la inversa. Más bien creemos que los microorganismos presentes en la cavidad oral de los individuos portadores de estas manchas, pese a ser ligeramente distintos a los de la población normal, no siempre son capaces de producir esta pigmentación. No solo dependería de los nutrientes disponibles que estuviesen en el entorno, ya sea de forma exógena o endógena, sino que también se tendrían que dar unas determinadas circunstancias. De esta forma, podría darse el caso que, en un preciso momento, el organismo entrara en un estado de “inmunodepresión”, tras el cual se abriría una “ventana inmunológica” o “de oportunidad” que permitiría el desequilibrio del ecosistema con la consiguiente producción de las pigmentaciones por los microorganismos causantes.

9. CONCLUSIONES



9. CONCLUSIONES

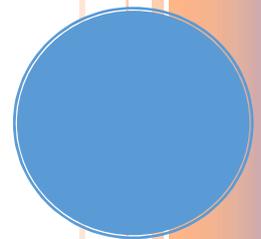
En resumen, y respondiendo al objetivo principal y específicos planteados en el presente estudio, podemos establecer las siguientes conclusiones:

No se producen, bajo las condiciones de este estudio, cambios en la reaparición de las pigmentaciones extrínsecas negras de origen bacteriano tras la aplicación de una fuente de luz de diodos con una longitud de onda de aproximadamente 475 nm en la superficie bucal de los dientes afectados de esta tinción.

- 1) La aplicación de la terapia fotodinámica bajo las condiciones de este estudio no altera el *intervalo de tiempo* en el cual aparecen de forma natural las pigmentaciones extrínsecas negras. La media de tiempo antes y después del empleo de la terapia fotodinámica fue el mismo, de 5,2 meses.
- 2) La aplicación de la terapia fotodinámica bajo las condiciones de este estudio no altera la *cantidad* de pigmentación extrínseca negra. Este tratamiento solo es beneficioso para un 64,5% de los pacientes en el primer mes tras la aplicación de la luz, produciéndose un empeoramiento progresivo, es decir, un aumento en la cantidad de la pigmentación, a medida que pasa el tiempo.
- 3) La aplicación de la terapia fotodinámica bajo las condiciones de este estudio no altera el *color* de las pigmentaciones extrínsecas negras. Si bien en el primer mes tras la aplicación de la luz el 22,6% de los pacientes presenta una coloración más clara o marronácea de las tinciones, con el tiempo todos los sujetos son propensos a mostrar una coloración negra. Asimismo, ningún paciente en el Tiempo de Restauración pasa de tener una coloración negra a una coloración más clara o marronácea.

- 4) La aplicación de la terapia fotodinámica bajo las condiciones de este estudio no modifica de forma estadísticamente significativa la presencia/ausencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* y *Porphyromonas gingivalis*, es decir, la población bacteriana de estos tres microorganismos no varía (9,7% vs 6,5% para *A. actinomycetemcomitans*, 29,03% vs 19,4% para *P. gingivalis* y destacando la presencia de *T. forsythia* con un 83,9% vs 80,6%).

10. BIBLIOGRAFÍA



1. Bellia L. Lo sbiancamento dentale come complemento motivazionale nella prevenzione orale [Dental bleaching as motivation in oral prevention]. *J Cosmet Dent.* 2010;4(1):28-34. Italian.
2. Heinrich-Weltzien R, Monse B, van Palenstein Helderma W. Black stain and dental caries in Filipino schoolchildren. *Community Dent Oral.* 2009;37(2):182-7.
3. Smalley JW, Silver J, Birss AJ, Whitnall R, Titler PJ. The haem pigment of the oral anaerobes *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* is composed of iron (III) protoporphyrin IX in the monomeric form. *Microbiology.* 2003;149(Pt 7):1711-8.
4. Shah HN, Bonnett R, Mateen B, Williams R. The porphyrin pigmentation of subspecies of *Bacteroides melaninogenicus*. *Biochem J.* 1979;180(1):45-50.
5. Leung KP, Subramaniam PS, Okamoto M, Fukushima H, Lai CH. The binding and utilization of hemoglobin by *Prevotella intermedia*. *FEMS Microbiol Lett.* 1998;162(2):227-33.
6. Duchesne P, Grenier D, Mayrand D. Binding and utilization of human transferrin by *Prevotella nigrescens*. *Infect Immun.* 1999;67(2):576-80.
7. Fujimura S, Shibata Y, Hirai K, Nakamura T. Binding of hemoglobin to the envelope of *Porphyromonas gingivalis* and isolation of the hemoglobin-binding protein. *Infect Immun.* 1996;64(6):2339-42.
8. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *J Gen Microbiol.* 2003;149(Pt 2):279-94.
9. Bandon D, Chabane-Lemboub A, Le Gall M. Les colorations dentaires noires exogènes chez l'enfant: Black-stains = Exogenous black dental discolourations at the child: Black-stains. *Arch Pediatre.* 2011;18(12):1348-52. French.
10. Lee Y, Straffon LH, Welch KB, Loesche WJ. The transmission of anaerobic periodontopathic organisms. *J Dent Res.* 2006;85(2):182-6.

11. Aquino DR, Nobre GC, Cortelli JR, Oliveira F, Prado A, Cavalca S. The impact of the maternal's periodontal status on the detection of periodontal pathogens in newborn children. *Rev odonto ciênc.* 2010;25(4):333-8.
12. Sahm N, Schwarz F, Aoki A, Becker J. Uso de la terapia fotodinámica antimicrobiana en el tratamiento periodontal y periimplantario [Use of the antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant treatment]. *Quintessenz.* 2011;21(2):105-15. Spanish.
13. Gursoy H, Ozcakil-Tomruk C, Tanalp J, Yilmaz S. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clin Oral Invest.* 2013;17(4):1113-25.
14. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, y cols. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Laser Surg Med.* 2006;38(5):468-81.
15. Fukui M, Yoshioka M, Satomura K, Nakanishi H, Nagayama M. Specific-wavelength visible irradiation inhibits bacterial growth of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.* 2008;43(2):174-78.
16. Soukos NS, Stultz J, Abernethy AD, Goodson JM. Phototargeting human periodontal pathogens in vivo. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2013 Dec 18 [accepted 2013 Nov 20];30(3):[about 10 p.]. Available from: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10103-013-1497-9#/page-1>
17. Liébana J, Baca P. 1st ed. *Microbiología oral*. Madrid (Spain): McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.; c1997. Chapter 31, Microbiología de las placas dentales; p. 429-45.
18. Ramón V, Gil FJ, Alpiste F. Cálculo dental y control químico de su formación [Dental tartar and chemical control of its formation]. *Period y Osteoint.* 2004;14(4):309-21. Spanish.

19. Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(7):471-80.
20. Zijng V, van Leeuwen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, y cols. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One* [Internet]. 2010 Feb 24 [accepted 2010 Jan 26];5(2):[about 9 p.]. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0009321>
21. Zambon JJ, Reynolds HS, Slots J. Black-pigmented *Bacteroides* spp. in the human oral cavity. *Infect Immun.* 1981;32(1):198-203.
22. Alaluusua S, Asikainen S. Detection and distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the primary dentition. *J Periodontol.* 1988;59(8):504-7.
23. Zimmer W, Wilson M, Marsh PD, Newman HN, Bulman J. *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the plaque of children without periodontitis. *Microb Ecol Health D.* 1991;4(5):329-36.
24. McClellan DL, Griffen AL, Leys EJ. Age and prevalence of *Porphyromonas gingivalis* in children. *J Clin Microbiol.* 1996;34(8):2017-9.
25. Morinushi T, Lopatin DE, Van Poperin N, Ueda Y. The relationship between gingivitis and colonization by *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in children. *J Periodontol.* 2000;71(3):403-9.
26. Tanner AC, Milgrom PM, Kent R Jr, Mokeem SA, Page RC, Liao SI, y cols. Similarity of the oral microbiota of pre-school children with that of their caregivers in a population-based study. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;17(6):379-87.

27. Makhoul IR, Sujov P, Ardekian L, Kassis I, Smolkin T, Abu-Elnaa'j I, y cols. Factors influencing oral colonization in premature infants. *Isr Med Assoc J.* 2002;4(2):98-102.
28. Tanaka S, Murakami Y, Seto K, Takamori K, Yosida M, Ochiai K, y cols. The detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the supragingival plaque of children with and without caries. *Pediatr Dent.* 2003;25(2):143-8.
29. Gafan GP, Lucas VS, Roberts GJ, Petrie A, Wilson M, Spratt DA. Prevalence of periodontal pathogens in dental plaque of children. *J Clin Microbiol.* 2004;42(9):4141-6.
30. Cortelli JR, Romeiro D, Cavalca S, Borges C, de Carvalho-Filho J, Nobre GC, y cols. Etiological analysis of initial colonization of periodontal pathogens in oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2008;46(4):1322-9.
31. Papaioannou W, Gizani S, Haffajee AD, Quirynen M, Mamai-Homata E, Papagiannoulis L. The microbiota on different oral surfaces in healthy children. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24(3):183-9.
32. Cavalca S, Cortelli JR, Romero D, Holzhausen M, Nobre GC, de Oliveira F, y cols. Clinical status and detection of periodontopathogens and *Streptococcus mutans* in children with high levels of supragingival biofilm. *Braz Oral Res.* 2009;23(3):313-8.
33. Doğan B, Şahan A, Ökte E, Sultan N, Asikainen SE. Consistent intrafamilial transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* despite clonal diversity. *J Periodontol.* 2008;79(2):307-15.
34. Kobayashi N, Ishihara K, Sugihara N, Kusumoto M, Yakushiji M, Okuda K. Colonization pattern of periodontal bacteria in Japanese children and mothers. *J Periodontal Res.* 2008;43(2):156-61.

35. Watson MR, Lopatin DE, Bretz WA, Ertel IJ, Loesche WJ. Detection of two anaerobic periodontopathogens in children by means of the BANA and ELISA assays. *J Dent Res.* 1991;70(7):1052-6.
36. Cabrera MY. Estudio microbiológico de la bacteria *Prevotella intermedia* en el surco gingival de gestantes con diferentes grados de placa bacteriana-Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé [dissertation]. [Lima (PE)]: Universidad nacional mayor de San Marcos; 2004. 104 p. Spanish.
37. Watson MR, Bretz WA, Loesche WJ. Presence of *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* in children correlated with periodontal disease of their parents. *J Dent Res.* 1994;73(10):1636-40.
38. Fukui K, Kato N, Kato H, Watanabe K, Tatematsu N. Incidence of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* carriage among family members with subclinical periodontal disease. *J Clin Microbiol.* 1999;37(10):3141-5.
39. Okada M, Hayashi F, Soda Y, Zhong X, Miura K, Kozai K. Intra-familial distribution of nine putative periodontopathogens in dental plaque samples analyzed by PCR. *Eur J Oral Sci.* 2004;46(3):149-56.
40. Ardila CM, Guzmán IC. Agrupaciones familiares en periodontitis crónica = Family groupings in chronic periodontitis. *Rev AMC.* 2011;15(6):953-61. Spanish.
41. César RO, Palomari DM, de Souza SL, Cirelli JA. Estudo comparativo da prevalência de periodontopatógenos suspeitos entre mães e filhos [Comparative study of the prevalence of suspect periodontopathogens between mother and their children]. *Rev Odontol UNESP.* 2003;32(1):19-24. Portuguese.
42. César RO, Palomari DM, de Souza SL, Cirelli JA. Transmission of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* between brazilian women with severe chronic periodontitis and their children. *Braz Dent J.* 2007;18(3):220-4.

43. Belcheva MD, Kiselova-Yaneva A, Rashkova M, Uzunov T, Krasteva A, Panaiotov S, y cols. Transmission of *Porphyromonas gingivalis* from caregivers to children. J of IMAB. 2012;18(2):157-62.
44. Tuite-McDonell M, Griffen AL, Moeschberger ML, Dalton RE, Fuerst PA, Leys EJ. Concordance of *Porphyromonas gingivalis* colonization in families. J Clin Microbiol. 1997;35(2):455-61.
45. Martelli FS, Mengoni A, Martelli M, Rosati C, Fanti E. Comparison of periodontal microbiological patterns in Italian spouses. Ig Sanità Pubbl. 2012;68(4):579-89.
46. Michalowicz BS, Aepli D, Virag JG, Klump DG, Hinrichs JE, Segal NL, y cols. Periodontal findings in adult twins. J Periodontol. 1991;62(5):293-9.
47. Bößmann KH. Zahnbürsten und ihr mögliches Infektionsrisiko [Toothbrushes and their potential risk of infection]. Zahnmed. 2001;91(22):50-2. German.
48. Contreras A, Arce R, Botero JE, Jaramillo A, Betancourt M. Toothbrush contamination in family members. Rev Clin Periodoncia Implantol Oral. 2010;3(1):24-6.
49. Malmberg E, Birkhed D, Norvenius G, Norén JG, Dahlén G. Microorganisms on toothbrushes at day-care centers. Acta Odontol Scand. 1994;52(2):93-8.
50. García-Ballesta C, Cortés O. 1st ed. Odontopediatría. La evolución del niño al adulto joven. 1a ed. Madrid (Spain): Ripano S.A.; c2011. Chapter 27, Introducción a los traumatismos dentales. Clasificación, etiología, historia clínica. Complicaciones de los traumas dentales; p. 361-71.
51. Manuel ST, Abhishek P, Kundabala M. Etiology of tooth discoloration: a review. Nig Dent J. 2010;18(2):56-63.
52. Sulieman M. An overview of tooth discoloration: extrinsic, intrinsic and internalized stains. Dent Update. 2005;32(8):463-71.

53. García-Ballesta C, Pérez L, Cortés O. 1st ed. Odontopediatría. La evolución del niño al adulto joven. 1a ed. Madrid (Spain): Ripano S.A.; c2011. Chapter 13, Anomalías de la dentición en desarrollo: número, tamaño, forma, estructura y color; p. 179-93.
54. Lin YT, Lin YT, Chen CL. A survey of the oral status of children undergoing liver transplantation. *Chan Gung Med J.* 2003;26(3):184-8.
55. Watts A, Addy M. Tooth discolouration and staining: a review of the literature. *Br Dent J.* 2001;190(6):309-16.
56. Bonilla V, Mantín J, Jiménez A, Llamas R. Alteraciones del color de los dientes [Discolouration of the teeth]. *Rev Eur Odonto-estom [Internet].* 2007 Feb 21[cited 2007 Feb 21];[about 32 p.]. Available from: <http://www.redoe.com/ver.php?id=51> Spanish
57. Mellanby M, Coumoulos H. Teeth of 5-year-old London school-children (second study). A comparison between 1929, 1943 and 1945. *Brit Med J.* 1946;2(4476):565-70.
58. Hassan ZS, Qasim AA. Oral hygiene condition among five years old Kindergarten Children in relation to level of parent education in Baghdad city Iraq. *J Fac Med Baghdad.* 2008;50(4):[5 p.].
59. Miller WD. The deposits upon the teeth, with special reference to green and metallic deposits. *Dent Cosmos.* 1894;36(4):253-73.
60. Mellanby M, Martin WJ, Barnes D. Teeth of 5-year-old London schoolchildren (1957) with a comparison of the results obtained from 1929 to 1957. *Brit Med J.* 1958;2(5110):1441-3.
61. James PM. A survey of dental and gingival conditions in school children. *Proc R Soc Med Jul.* 1963;56(7):620-4.
62. Hattab FN, Qudeimat MA, Al-Rimawi HS. Dental discoloration: an overview. *J Esthet Dent.* 1999;11(6):291-310.

63. Huamán M. Manejo clínico de la mancha negra en odontología = Clinical management of black stains in dentistry. *Odontol Pediatr.* 2013;12(2):129-39. Spanish.
64. Reis D, Claro AC, César M, Cardoso AO. Quantificação de *Streptococos* do grupo *Mutans* em crianças portadoras de manchas extrínsecas nos dentes = Quantification of *Streptococci* of the group *Mutans* in children bearers of extrinsic stains in the teeth. *Rev biociênc.* 2003;9(4):53-8. Portuguese.
65. de Souza G, Brolezi PC, Trigo F, Pettorossi JC, Pinheiro SL. Manchas extrínsecas negras do esmalte = Tooth black stains. *Rev Ciênc Méd Campinas.* 2003;12(4):375-80. Portuguese.
66. Loureiro A, de Paula M, de Oliveira SM, de Sousa CV. Manchas extrínsecas negras: relato de caso clínico = Black extrinsic stain – case report. *Rev Fac Odontol Lins* 2013;23(1):59-64. Portuguese.
67. Tirth A, Srivastava BK, Nagarajappa R, Tangade P, Ravishankar TL. An investigation into black tooth stain among school children in Chakkar Ka Milak of Moradabad city, India. *J Oral Health Comm Dent.* 2009;3(2):34-7.
68. López TM. Manchas dentárias negras em escolares de 8 a 12 anos: prevalência e fatores associados [master's thesis]. [Pelotas (BR)]: Universidad Federal de Pelotas; 2012. 71 p. Portuguese.
69. Koch MJ, Bove M, Niekusch U. Prävalenz schwarzer Zahnbeläge bei Schulkindern [Prevalence black stain in schoolchildren]. *Dtsch Zahnärztl Z.* 1996;51(11):664-5. German.
70. Shourie KL. Mesenteric line or pigmented plaque: a sign of comparative freedom from caries. *J Am Dent Assoc.* 1947;35(1):805-7.

71. Koch MJ, Bove M, Schroff J, Perlea P, García-Godoy F, Staehle HJ. Black stain and dental caries in schoolchildren in Potenza, Italy. *J Dent Child*. 2001;68(5-6):353-5.
72. Gasparetto A, Conrado CA, Maciel SM, Yiokihiro E, Chicarelli M, Zanata RL. Prevalence of black tooth stains and dental caries in Brazilian schoolchildren. *Braz Dent J*. 2003;14(3):157-61.
73. Żyła T, Kawala B, Antonszweska-Smith J, Kawala M. Black stain and dental caries: a review of the literature. *Biomed Research Int* [Internet]. 2015 Jan [accepted 2015 Jan 22]. 2015:[about 6 p.]. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/469392/cta/>
74. Mouton C, Robert JC. 1st ed. *Bacteriología bucodental*. Barcelona (Spain): Masson; c1995. Chapter 4, Bacterias gramnegativas; p. 49-60.
75. Theilade J, Pang KM. Scanning electron microscopy of black stain on human permanent teeth. *Scanning Microscopy*. 1987;1(4):1983-9.
76. Slots J. The microflora of black stain on human primary teeth. *Scand J Dent Res*. 1974;82(7):484-90.
77. Theilade J, Slots J, Fejerskov O. The ultrastructure of black stain on human primary teeth. *Scand J Dent Res*. 1973;81(7):528-32.
78. Teixeira M. Avaliação microbiana das manchas dentárias extrínsecas negras em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico [dissertation]. [Jataí (BR)]: Universidad Federal de Goiás; 2011. 57 p. Portuguese.
79. Teixeira M, Leandro M, Ribeiro-Dias F, Pimenta FC. Biofilms of black tooth stains: PCR analysis reveals presence of *Streptococcus mutans*. *Braz Dent J*. 2012;23(5):555-8.

80. Pessoa L, Galvão V, Damante C, Passanezi AC. Removal of black stains from teeth by photodynamic therapy: clinical and microbiological analysis. *BMJ* [Internet]. 2015 Dec 23 [accepted 2015 Dec 5]:[about 5 p.]. Available from: <http://casereports.bmj.com/content/2015/bcr-2015-212276.abstract>
81. Heinrich-Weltzien R, Bartsch B, Eick S. Dental caries and microbiota in children with black stain and non-discoloured dental plaque. *Caries Res.* 2014;48(2):118-25.
82. Saba C, Solidani M, Berlutti F, Vestri A, Ottolenghi L, Polimeni A. Black stains in the mixed dentition: A PCR microbiological study of the etiopathogenic bacteria. *J Clin Pediatr Dent.* 2006;30(3):219-24.
83. García HO. Evaluación de la frecuencia bacteriana de las pigmentaciones cromógenas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación automática en muestras extraídas de niños que acuden a la clínica docente de la UPC [dissertation]. Lima (PE): Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas; 2014. 66 p. Spanish.
84. Li Y, Zhang Q, Zhang F, Liu R, Liu H, Chen F. Analysis of the microbiota of black stain in the primary dentition. *PLoS One* [Internet]. 2015 Sept 4 [accepted 2015 Aug 11];10(9):[about 12 p.]. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0137030>
85. Dougherty WJ, Bae KS, Watkins BJ, Baumgartner JC. Black-pigmented bacteria in coronal and apical segments of infected root canals. *J Endod.* 1998;24(5):356-68.
86. Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS, Xia T. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J Endod.* 1999;25(6):413-5.

87. Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, y cols. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immun.* 2005;20(4):211-5.
88. Indiarti IS, Rustan Y, Budiardjo SB. Identification quantity of Actinomyces in children saliva with black stain in tooth enamel surface. *Int J Clin Prev Dent.* 2013;9(3):163-8.
89. Bartsch B. Black stain. Epidemiologische Untersuchung und quantitativer Nachweis kario- und parodontopathogener Keime mittels Real-time-PCR [dissertation]. [Jena (DE)]: Universität Friedrich-Schiller; 2011. 84 p. German.
90. Shah HN, Gharbia SE. Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1992;42(4):542-6.
91. Castillo AM, Liébana J. *Microbiología oral*. 1st ed. Madrid (Spain): McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.; c1997. Chapter 16, Bacterias anaerobias estrictas; p. 241-54.
92. Shah HN, Collins MD. Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*. *Int J Syst Bacteriol.* 1988;38(1):128-31.
93. van Steenberg TJ, van Winkelhoff AJ, Mayrand D, Grenier D, de Graaff J. *Bacteroides endodontalis* sp. nov., an asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species from infected dental root canals. *Int J Syst Bacteriol.* 1984;34(2):118-20.
94. Castillo AM, Liébana J. *Microbiología oral*. 1st ed. Madrid (Spain): McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.; c1997. Chapter 17, Bacterias anaerobias facultativas; p. 255-66.

95. Baca P, Liébana J. 1st ed. Microbiología oral. Madrid (Spain): McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.; c1997. Chapter 33, Microbiología de la caries dental; p. 447-62.
96. Liébana J, Castillo AM, Gutiérrez J. 1st ed. Microbiología oral. Madrid (Spain): McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.; c1997. Chapter 15, Género *Streptococcus*; p. 219-39.
97. Reid JS, Beeley JA. Biochemical studies on the composition of gingival debris from children with black extrinsic tooth stain. *Caries Res.* 1976;10(5):363-9.
98. Parnas L, Chevion M, Berenshtein E, Faibis S, Moskovitz M. Are there metallic traces in black extrinsic dental stain? *Quintessence Int.* 2013;44(5):427-32.
99. Jakubovics NS. Intermicrobial interactions as a driver for community composition and stratification of oral biofilms. *J Mol Biol.* 2015;427(23):3662-75.
100. Marsh PD, Bradshaw DJ. Physiological approaches to the control of oral biofilms. *Adv Dent Res.* 1997;11(1):176-85.
101. Shimotahira N, Oogai Y, Kawada-Matsuo M, Yamada S, Fukutsuji K, Nagano K, y cols. The surface layer of *Tannerella forsythia* contributes to serum resistance and oral bacterial coaggregation. *Infect Immun.* 2013;81(4):1198-1206.
102. Eriksen HM, Nordbø H, Kantanen H, Ellingsen JE. Chemical plaque control and extrinsic tooth discoloration: a review of possible mechanisms. *J Clin Periodontol.* 1985;12(5):345-50.
103. Reid JS, Beeley JA, MacDonald DG. Investigations into black extrinsic tooth stain. *J Dent Res.* 1977;56(8):895-9.
104. Gibbons RJ, Macdonald JB. Hemin and vitamin K compounds as required factors for the cultivation of certain strains of *Bacteroides melaninogenicus*. *J Bacteriol.* 1960;80(2):164-70.

105. Duerden BI. Pigment production by *Bacteroides* species with reference to sub-classification. J Med Microbiol. 1975;8(1):113-25.
106. Tracy O. Pigment production in Bacteroides. J Med Microbiol. 1969;2(3):309-15.
107. Guan SM, Nagata H, Maeda K, Kuboniwa M, Minamino M, Shizukuishi S. Purification and characterization of a hemoglobin-binding outer membrane protein of *Prevotella intermedia*. FEMS Microbiol Lett. 2004;235(2):333-9.
108. Guan SM, Nagata H, Shizukuishi S, Wu JZ. Degradation of human hemoglobin by *Prevotella intermedia*. Anaerobe. 2006;12(5-6):279-82.
109. Leung KP, Folk SP. Effects of porphyrins and inorganic iron on the growth of *Prevotella intermedia*. FEMS Microbiol Lett. 2002;209(1):15-21.
110. Miyashita M, Oishi S, Kiso A, Kikuchi Y, Ueda O, Hirai K, y cols. Hemoglobin binding activity and hemoglobin-binding protein of *Prevotella nigrescens*. Eur J Med Res. 2010;15(7):314-8.
111. Smalley JW, Birss AJ, Whitnall R, Silver J. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with oxyhaemoglobin and deoxyhaemoglobin. Biochem J. 2002;362:239-45.
112. Marsh PD. Contemporary perspective on plaque control. Br Dent J. 2012;212(12):601-6.
113. Akyüz S, Garan A, Sarp M. Prevalence of black stain and dental caries in children attending a university pediatric dentistry clinic in Istanbul. MÜSBED. 2015;5(2):109-14.

114. Trevisan C, Mialhe FL, Pereira R. Prevalência de manchas dentais extrínsecas negras e sua relação com a cárie dentária em crianças do município de Santa Terezinha de Itaipu - PR = Prevalence of black extrinsic dental stains and its relationship with children dental decay in the town of Santa Terezinha de Itaipu - PR]. RFO. 2008;13(2):22-6. Portuguese.
115. Guzmán NC, Super SS, Pinochet AN, Maiza PB, Vieira N. Frecuencia de tinciones dentales en escolares de San Juan de la Costa, Chile, 2012 = Frequency of dental stains in schoolchildren of San Juan de la Costa, Chile, 2012. Rev Cubana Estomatol. 2015;52(1):2-7. Spanish.
116. Garcia JM, Gonzalez M, Seoane J, Llorente S, Diaz JJ, Garcia-Pola MJ. Prevalence of black stain and associated risk factors in preschool Spanish children. *Pediatr Int.* 2013;55(3):355-9.
117. Lloret M, Montiel JM, Catalá M, Almerich JM. Tinción extrínseca negra en escolares de Valencia, España [Black exogenous stain in schoolchildren of Valencia, Spain]. *Odontol Pediátr (Madrid)*. 2012;20(3):171-8. Spanish.
118. Paredes V, Paredes C. Tinción cromógena: un problema habitual en la clínica pediátrica = Black stain: a common problem in pediatrics. *An Pediatr.* 2005;62(3):258-60. Spanish.
119. Bircher ME. Mancha negra y caries en dentición decidua y mixta [dissertation]. [Rosario (AR)]: Universidad Nacional de Rosario; 2002. 70 p. Spanish.
120. Mayta-Tovalino FR, Torres-Quevedo JC. Pigmentaciones negras extrínsecas y su asociación con caries dental en niños con dentición mixta [Exogenous black staining and its association with dental caries in children with mixed dentition]. *Rev Estomatol Herediana*. 2008;18(1):16-20. Spanish.
121. Mahmoodian J, Hashemi S. The frequency of different types of primary teeth discoloration in children in paediatric department of Faculty of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences, in 1999-2001. *J Dent (Tehran)*. 2004;1(2):63-5.

122. Bhat S. Black tooth stain and dental caries among Udaipur school children. *Int J Public Health Dent.* 2010;1(1):11-5.
123. Chen X, Zhan JY, Lu HX, Ye W, Zhang W, Yang WJ, y cols. Factors associated with black tooth stain in Chinese preschool children. *Clin Oral Invest.* 2014;18(9):2059-66.
124. Pushpanjali K, Khanal SS, Niraula SR. The relationship of dental extrinsic stains with the concentration of trace elements in water sources in a district of Nepal. *Oral Health Prev Dent.* 2004;2(1):33-7.
125. Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK. Effects of iron salts in sucrose on dental caries and plaque in rats. *Archs oral Biol.* 1997;42(5):377-83.
126. França-Pinto CC, Cenci MS, Correa MB, Romano AR, Peres MA, Peres KG, y cols. Association between black stains and dental caries in primary teeth: findings from a brazilian population-based birth cohort. *Caries Res.* 2012;46(2):170-6.
127. Rebelo K, Batista MJ, Rocha J, de Sousa ML. Extrinsic tooth enamel color changes and their relationship with the quality of water consumed. *Int J Environ Res Public Health.* 2012;9(10):3530-9.
128. Delaney JE, Ratzan SK, Kornman KS. Subgingival microbiota associated with puberty: studies of pre-, circum-, and postpubertal human females. *Pediatr Dent.* 1986;8(4):268-75.
129. Shmuly T, Zini A, Yitschaky M, Yitschaky O. Can black extrinsic tooth discoloration predict a lower caries score rate in young adults? *Quintessence Int.* 2014;45(5):439-44.
130. Levine M, Owen WL, Avery KT. Antibody response to *Actinomyces* antigen and dental caries experience: implications for caries susceptibility. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12(6):764-9.

131. Boka V, Trikaliotis A, Kotsanos N, Karagiannis V. Dental caries and oral health-related factors in a sample of Greek preschool children. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2013;14(6):363-8.
132. Fernandes M, Bonucci C, Rodrigues G, Duarte DA, de Oliveira R. Anemia ferropriva e pigmentação dentária por sulfato ferroso: revisão de literatura e relato de casos clínicos [Iron deficiency anemia and tooth discoloration: literature review and clinical cases]. *UFES Rev Odont.* 2008;10(1):57-61. Portuguese.
133. American Academy of Pediatric Dentistry. Guideline on the role of dental prophylaxis in pediatric dentistry. *Pediatr Dent.* 2007;33(6):11-2.
134. Alonso B, Borrego R, Hernández C, Pérez JA, Romero C. 1st ed. El láser. La luz de nuestro tiempo. Salamanca (Spain): Globalia Ediciones Anthemia; c2010. Chapter 1, Conceptos básicos de Óptica; p. 9-22.
135. Milli J. El viaje del fotón [Photon's travel]. *Galactic Magazine* [Internet]. 2014 Jan 21 [undated review]; [about. 7 p.]. Available from: http://galacticmagazine.org/2014/wp-content/uploads/2013/12/GAMA0_01_ElViajeDelFoton.pdf Spanish
136. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontology 2000.* 2011;55(1):143-66.
137. Feuerstein O, Persman N, Weiss EI. Phototoxic effect of visible light on *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*: an *in vitro* study. *J Photochem Photobiol.* 2004;80(3):412-5.
138. Song HH, Lee JK, Um HS, Chang BS, Lee SY, Lee MK. Phototoxic effect of blue light on the planktonic and biofilm state of anaerobic periodontal pathogens. *J Periodontal Implant Sci.* 2013;43(2):72-8.

139. Chui C, Hiratsuka K, Aoki A, Takeuchi Y, Abiko Y, Izumi Y. Blue LED inhibits the growth of *Porphyromonas gingivalis* by suppressing the expression of genes associated with DNA replication and cell division. *Laser Surg Med.* 2012;44(10):856-64.
140. Soukos NS, Som S, Abernethy AD, Ruggiero K, Dunham J, Lee C, y cols. Phototargeting oral black-pigmented bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(4):1391-6.
141. Feuerstein O, Ginsburg I, Dayan E, Veler D, Weiss EI. Mechanism of visible light phototoxicity on *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. *J Photochem Photobiol.* 2005;81(5):1186-9.
142. Henry CA, Dyer B, Wagner M, Judy M, Matthews JL. Phototoxicity of argon laser irradiation on biofilms of *Porphyromonas* and *Prevotella* species. *J Photochem Photobiol B.* 1996;34(2-3):123-8.
143. Sterer N, Feuerstein O. Effect of visible light on malodour production by mixed oral microflora. *J Med Microbiol.* 2005;54(Pt 12):1225-9.
144. Fontana CR, Abernethy AD, Som S, Ruggiero K, Doucette S, Marcantonio RC, y cols. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *J Periodontal Res.* 2009;44(6):751-9.
145. Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2003;18(1):51-5.
146. Polansky R, Haas M, Heschl A, Wimmer G. Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2009;36(7):575-80.

147. Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, Becker J, Schwarz F, Rössler R, y cols. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2008;79(9):1638-44.
148. Chitsazi MT, Shirmohammadi A, Shirmohammadi M, Kashefimehr A, Ghasemi V. Efficacy of photodynamic therapy as an adjunct to full-mouth root planning in the treatment of periodontitis assessed by real-time PCR: a microbiological and clinical study. *J Periodontal Implant Dent.* 2015;7(1):26-32.
149. Annaji S, y cols. Efficacy of photodynamic therapy and lasers as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of aggressive periodontitis - a clinical and microbiologic short term study. *J Clin Diagn Res [Internet].* 2016 Feb 1 [revised 2015 Aug 5]:10(2):8-12. Available from: http://www.jcdr.net/article_fulltext.asp?issn=0973-709x&year=2016&volume=10&issue=2&page=ZC08&issn=0973-709x&id=7165
150. Rühling A, Fanghänel J, Houshmand M, Kuhr A, Meisel P, Schwahn C, y cols. Photodynamic therapy of persistent pockets in maintenance patients - a clinical study. *Clin Oral Invest.* 2010;14(6):637-44.
151. Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis in vitro*. *J Photochem Photobiol.* 1997;65(6):1026-31.
152. Kömerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. *In vivo* killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated of photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(3):932-40.
153. Garcia R, Simões ME, Franco BE, Melo A, Araujo R, Miranda C, y cols. Photodynamic therapy as novel treatment for halitosis in adolescents: a case series study. *Laser Med Sci.* 2014;5(3):146-52.

154. López-Jiménez L, Fusté E, Martínez-Garriga B, Arnabat-Domínguez J, Vinuesa T, Viñas M. Effects of photodynamic therapy on *Enterococcus faecalis* biofilms. *Lasers Med Sci.* 2015;30(5):1519-26.
155. Soria-Lozano P, Gilaberte Y, Paz-Cristobal MP, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, Aporta J, y cols. In vitro effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. *BMC Microbiology* [Internet]. 2015 Sept 26 [accepted 2015 Sept 21]:15(1):[about 8 p.]. Available from: <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-015-0524>
156. Fayyaz F, Rahimi R, Rassa M, Yaghoobi RH, autores. Photodynamic antimicrobial chemotherapy, a pathway for photo-inactivation of bacteria by porphyrin compounds. 1st International Electronic Conference on Molecular Science: Cell Signaling, Survival and Growth; 2015 cited Oct 15-22; Basel, Switzerland. Basel: MPDI Sciforum; Oct 2015. 6 p.
157. Yilmaz S, Kuru B, Kuru L, Noyan Ü, Argun D, Kadir T. Effect of galium arsenide diode laser on human periodontal disease: a microbiological and clinical study. *Laser Surg Med.* 2002;30(1):60-6.
158. Ramos R, Schwartz-Filho HO, Belém A, Pompermaier G, Freitas R, Taba M, y cols. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *J Periodontol.* 2009;80(1):98-105.
159. Andersen R, Loebel N, Hammond D. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planning. *J Clin Dent.* 2007;18(2):1-5.
160. Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, y cols. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection *in vitro*. *J Endod.* 2008;34(6):728-34.

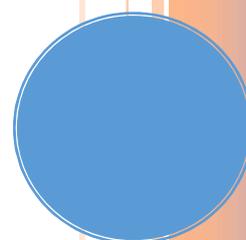
161. Braun A. Anwendungen und Möglichkeiten der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie (aPDT) [Applications and opportunities of the antimicrobial photodynamic therapy (aPDT)]. *LaserZahnheilkunde*. 2007;3(7):159-64. German.
162. Xu Y, Young MJ, Battaglino RA, Morse LR, Fontana CR, Pagonis TC, y cols. Endodontic antimicrobial photodynamic therapy: Safety assessment in mammalian cell cultures. *J Endod*. 2009;35(11):1567-72.
163. Al-Zahrani MS, Austah ON. Photodynamic therapy as an adjunctive to scaling and root planning in treatment of chronic periodontitis in smokers. *Saudi Med J*. 2011;32(11):1183-8.
164. Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rössler R, Gutknecht N, Sculean A. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2009 Sept 24 [accepted 2007 Nov 30];24(5):[about 8 p.]. Available from: http://www.helbo.de/fileadmin/docs/wissenschaft/Article_J_Lasers%20Med%20Science_Sculean_0508.pdf
165. Lulic M, Leiggener I, Salvi GE, Ramseier CA, Mattheos N, Lang NP. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2009;36(8):661-6.
166. Park JH, Lee JK, Um HS, Chang BS, Lee SY. A periodontitis-associated multispecies model of an oral biofilm. *J Periodontal Implant Sci*. 2014;44(2):79-84.

167. Watanabe M, Takahashi N, Takada H, editores. Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. Interface Oral Health Science- Proceedings of the International Symposium for Interface Oral Health; 2005 Feb 2-3; Sendai, Japan. Amsterdam(NL): Elsevier B.V. (Corporate Office); 2005 Feb. 10 p.
168. Periasamy S, Kolenbrander PE. Mutualistic biofilm communities develop with *Porphyromonas gingivalis* and initial, early, and late colonizers of enamel. J Bacteriol. 2009;191(22):6804-11.
169. Diaz PI, Zilm PS, Rogers AH. *Fusobacterium nucleatum* supports the growth of *Porphyromonas gingivalis* in oxygenated and carbon-dioxide-depleted environments. Microbiology. 2002;148(Pt 2):467-72.
170. Inagaki S, Kuramitsu HK, Sharma A. Contact-dependent regulation of a *Tannerella forsythia* virulence factor, BspA, in biofilms. FEMS Microbiol Lett. 2005;249(2):291-6.
171. Zhu W, See SW. Surface interactions between two of the main periodontal pathogens: *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia*. J Periodontal Implant Sci. 2016;46(1):2-9.
172. Sahingur SE, Xia XJ, Alamgir S, Honma K, Sharma A, Schenkein HA. DNA from *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* induce cytokine production in human monocytic cell lines. Mol Oral Microbiol. 2010;25(2):123-35. doi 10.1111/j.2041-1014.2009.00551.x.
173. Iniesta M, Herrera D, Serrano J, Sanz M. Análisis de los factores de virulencia de los patógenos de asociación fuerte con la periodontitis: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia* [Analysis of virulence factors of the pathogens with periodontal disease strong association: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia*]. Period y Osteoint. 2008;18(2):109-15. Spanish.

174. Smith RN, Brook AH, Elcock C. The quantification of dental plaque using an image analysis system: reliability and validation. *J Clin Periodontol.* 2001;28(12):1158-62.
175. Smith RN, Rawlinson A, Lath D, Elcock C, Walsh TF, Brook AH. Quantification of dental plaque on lingual tooth surfaces using image analysis: reliability and validation. *J Clin Periodontol.* 2004;31(7):569-73.
176. Janalik P, Fichtel T, Sperka P, Omasta M, Rauser P. Three-dimensional optical assessment of experimental iatrogenic mechanical damage to canine dental enamel caused by a sonic scaler. *Vet Med (Praha).* 2014;59(6):293-8.
177. Paramashivaiah R, Prabhuji ML. Mechanized scaling with ultrasonics: Perils and proactive measures. *J Indian Soc Periodontol.* 2013;17(4):423-8.
178. Vono HZ, de Oliveira JE, Gonzalez B, Moreira MA, Bonifácio SM. Airpolishing effect on bovine enamel and the posterior remineralizing effect of saliva. An *in vitro* study. *J Appl Oral Sci.* 2006;14(3):193-7.
179. Marques H, Rios D, Camargo RC, Moreira MA. Effect of different prophylaxis methods on sound and demineralized enamel. *J Appl Oral Sci.* 2006;14(2):117-23.
180. Goebel S, Jost-Brinkmann PG. Wirkung von Wasser-Pulver-Strahlgeräten auf die Oberflächenspannung von Zahnschmelz [Effect of water - powder - jet devices on the surface tension of enamel]. *ZMK.* 2002;18(3):112-4. German.
181. Yamaguchi H, Kobayashi K, Arai T. In vivo evaluation of human pulp sensitivity after Nd:YAG laser irradiation. *J Oral Laser Applications.* 2005;5(2):81-4.
182. Wu M, Chen SW, Jiang SY. Relationship between gingival inflammation and pregnancy. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2015 Aug [accepted 2014 Aug 28];2015:1-10. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/mi/2015/623427/> doi 10.1155/2015/623427

183. Ahmed N, Parthasarathy H, Arshad M, Victor DJ, Mathew D, Sankari S. Assessment of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Down's syndrome subjects and systemically healthy subjects: A comparative clinical trial. J Indian Soc Periodontol. 2014;18(6):728-33.
184. Scannapieco FA, Yu J, Raghavendran K, Vacanti A, Owens SI, Wood K, et al. A randomized trial of chlorhexidine gluconate on oral bacterial pathogens in mechanically ventilated patients. Crit Care Med [Internet]. 2009 Jul 15 [reviewed 2009 Jun 23];13(4):[about 12 p.]. Available from: <http://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/cc7967>
185. Poulet PP, Duffaut D, Barthet P, Brumpt I. Concentrations and *in vivo* antibacterial activity of spiramycin and metronidazole in patients with periodontitis treated with high-dose metronidazole and the spiramycin/metronidazole combination. J Antimicrob Chemother. 2005;55(3):347-51.

11. ANEXOS



ANEXO A

PACIENTE:
FECHA:

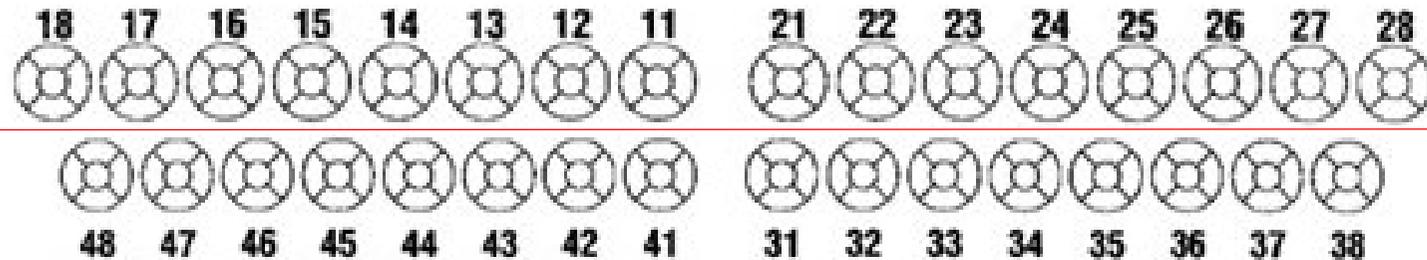
CLASIFICACIÓN PIGMENTACIONES EXTRÍNSECAS NEGRAS DE ORIGEN BACTERIANO (Gasparetto y cols.⁷²)

- 1) Puntos pigmentados o líneas incompletas paralelas al margen gingival
- 2) Líneas continuas pigmentadas, fácilmente observables y limitadas a la mitad del tercio cervical de la superficie dental
- 3) Pigmentación que se extiende más allá del tercio cervical

Vestibular

Vestibular

Palatino/lingual



Vestibular

Vestibular

NOTAS:

ANEXO B

CÁLCULO DE LA POTENCIA DE LA LÁMPARA GLO BRILLIANT

(GLO™ Science LLC, New York, America)

Datos disponibles:

- Longitud de onda de la lámpara (según empresa comercializadora): 475 nm.
- Superficie aproximada de la lámpara: 10 cm².
- Irradiación: energía empleada = 16 minutos (960 segundos).
- Densidad de iluminancia calculada con el colorímetro Chroma Meter CL-200® (Konica Minolta Sensing, Inc.; Tokyo, Japan): 151 Lux.
- Irradiancia necesaria para producir 1 Lux a 555 nm (color verde): 1,464 mW/m².

$$1 \text{ Lux (475 nm)} = \frac{555 \cancel{\text{nm}}}{475 \cancel{\text{nm}}} \times \frac{1,464 \text{ mW/m}^2}{\text{m}^2} = 1,7106 \text{ mW/m}^2$$

$$X = 151 \text{ Lux} \times \frac{1,7106 \text{ mW}}{\text{m}^2} = \frac{258,3 \text{ mW}}{\text{m}^2} \times \frac{\text{m}^2}{10000 \text{ cm}^2} =$$

0,02583 mW/cm²

Potencia

$$\frac{0,02583 \text{ mW}}{\text{cm}^2} \times 10 \cancel{\text{cm}^2} = 0,2583 \text{ mW} = \mathbf{0,0002583 \text{ W}}$$

Potencia global

$$\text{Energía: } 0,0002583 \text{ W} \times 960 \text{ seg} = 0,2479 \text{ J}$$

$$\frac{\text{Energía}}{\text{Superficie}} = \frac{0,2479 \text{ J}}{10 \text{ cm}^2} = \mathbf{0,02479 \text{ J/cm}^2}$$

