



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESPECIALIDAD EN ORTODÓNCA**



TESIS:

***“VALORACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ÓXIDO
DIALIL DISULFURO-MODIFICADO
EN BIOFILM PROCEDENTE DE APARATOLOGÍA ORTODÓNCA”***

**P R E S E N T A:
C.D. MARCOS GÓMEZ SOSA**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN ORTODONCIA**

**ASESOR:
M.C. HECTOR RUIZ REYES**

**COASESOR:
C.D.E.O. VIDAL ALMANZA ÁVILA**

**MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO
JUNIO DE 2017**

Contenido

Resumen.....	4
Abstract.....	5
1. Introducción.....	6
2. Marco teórico.....	8
2.1 Antecedentes generales.....	8
2.1.1 Biofilm.....	8
2.1.1.1 Formación del biofilm.....	8
2.1.1.2 Conformación patógena del biofilm oral.....	9
2.1.1.2.1 Biofilm cariogénico.....	9
2.1.1.2.2 Biofilm periodontal.....	10
2.1.1.2.3 Biofilm fúngico.....	11
2.1.1.3 Resistencia a antibióticos.....	11
2.1.1.3.1 Índice de crecimiento disminuido.....	11
2.1.1.3.2 Heterogeneidad.....	12
2.1.1.3.3 Percepción de quórum.....	12
2.1.1.3.4 Mutación.....	13
2.1.1.3.5 Matriz del biofilm.....	13
2.1.2 Biofilm oral en pacientes ortodóncos.....	13
2.1.2.1 Complicaciones provocadas por biofilms durante el tratamiento ortodóncico.....	14
2.1.2.1.1 Desmineralización del esmalte.....	14
2.1.2.1.2 Inflamación de tejidos blandos.....	14
2.1.2.1.3 Otras consecuencias de biofilms en ortodoncia.....	14
2.1.3 Métodos de tratamiento y prevención de biofilm en ortodoncia.....	15
2.1.3.1 Remoción mecánica.....	15
2.1.3.2 Control por medios químicos.....	15
2.2 Antecedentes específicos.....	16
2.2.1 Actividad antimicrobiana del Óxido Dialil Disulfuro.....	16
2.2.2 Actividad inmunoreguladora del Óxido Dialil Disulfuro.....	19
3. Planteamiento del problema.....	21
3.1 Pregunta de investigación.....	22
4. Justificación.....	23
5. Hipótesis.....	25

VALORACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ÓXIDO DIALIL DISULFURO-MODIFICADO EN BIOFILM PROCEDENTE DE APARATOLOGÍA ORTODÓNICA

5.1 Hipótesis de trabajo.....	25
5.2 Hipótesis nula.....	25
6. Objetivos.....	26
6.1 Objetivo general.....	26
6.2 Objetivos específicos.....	26
7. Material y métodos.....	27
7.1 Universo de estudio.....	27
7.2 Tipo de estudio.....	27
7.3 Criterios de elegibilidad.....	27
7.3.1 Criterios de inclusión.....	27
7.3.2 Criterios de exclusión.....	27
7.4 Operación de variables.....	27
7.4.1 Variables dependientes.....	27
7.4.2 Variables independientes.....	27
7.5 Materiales.....	28
7.6 Metodología.....	29
7.6.1 Etapa 1: Recolección de muestra.....	29
7.6.2 Etapa 2: Pruebas de inmersión.....	30
7.6.3 Etapa 3: Evaluación de crecimiento bacteriano.....	31
7.6.4 Etapa 4: Identificación de bacterias por tinción de Gram.....	33
7.6.5 Análisis topográfico de los brackets por Microscopia Electrónica.....	34
7.7 Análisis bioestadístico.....	35
8. Resultados.....	36
8.1 Grupo control.....	36
8.1.1 Registro de crecimiento bacteriano.....	36
8.1.2 Análisis bioestadístico.....	37
8.2 Grupo 1 (Colgate).....	38
8.2.1 Registro de crecimiento bacteriano.....	38
8.2.2 Análisis bioestadístico.....	39
8.3 Grupo 2 (Oral B).....	41
8.3.1 Registro de crecimiento bacteriano.....	41
8.3.2 Análisis bioestadístico.....	42
8.4 Grupo 3 (Clorhexidina).....	44
8.4.1 Registro de crecimiento bacteriano.....	44
8.4.2 Análisis bioestadístico.....	45

VALORACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ÓXIDO DIALIL DISULFURO-MODIFICADO
EN BIOFILM PROCEDENTE DE APARATOLOGÍA ORTODÓNICA

8.5	Grupo 4 (ODD-M).....	47
8.5.1	Registro de crecimiento bacteriano.....	47
8.5.2	Análisis bioestadístico.....	48
8.6	Evaluación de crecimiento bacteriano entre grupos.....	50
8.6.1	Registro de crecimiento bacteriano.....	50
8.6.2	Análisis bioestadístico.....	51
8.7	Identificación de bacterias por tinción de Gram.....	53
8.8	Análisis topográfico de los brackets.....	54
8.8.1	Brackets sin sanitizar.....	54
8.8.2	Brackets sanitizados.....	57
9.	Discusión.....	60
10.	Conclusión.....	63
11.	Referencias.....	64

Resumen.

Introducción. El uso de aparatología ortodónica promueve la acumulación de biofilm bacteriano, haciendo necesaria la utilización de enjuagues bucales para su control. El óxido dialil disulfuro modificado (ODDM) es una solución antiséptica que podría utilizarse como enjuague para el control de biofilm ortodónico.

Objetivo. Evaluar la efectividad antimicrobiana del ODDM en biofilm proveniente de aparatología ortodónica en relación a enjuagues bucales a base de cetilpiridinio (CPC) y colutorio de clorhexidina.

Material y métodos. Se utilizaron 13 brackets retirados de un paciente distribuidos en 4 grupos: Colgate Plax® (CPC/NaF); Oral B® (CPC); Peroxidín® (Clorhexidina); Accua Aséptic® (ODDM). Un bracket se utilizó como control. Los brackets fueron sumergidos en las soluciones y posteriormente colocados en caldo tioglicolato. Se evaluó el crecimiento bacteriano cada 24 horas durante 5 días, utilizando el método de turbidimetría. Se utilizó t student por comparación de muestras independientes a $\alpha/2=0.05$.

Resultados. Los enjuagues bucales presentaron los mayores índices de unidades formadoras de colonias (UFC), Colgate Plax® reportó un crecimiento de $60E7 \pm 22.6E7$ UFC/ml y Oral B®: $36E7 \pm 23.2E7$ UFC/ml. Peroxidín® ($18E7 \pm 15.2E7$ UFC/ml) y Accua Aséptic® ($8E7 \pm 13.7E7$) presentaron un índice de contaminación menor a los enjuagues y al grupo control ($84E7 \pm 39.1E7$), $P < 0.05$. Accua Aséptic® mostró ser igualmente efectivo en la inhibición del crecimiento bacteriano en relación al colutorio de clorhexidina ($P > 0.05$).

Conclusión. El efecto antimicrobiano mostrado por el ODDM lo hace un candidato atractivo para uso terapéutico en el control de biofilm ortodónico.

Palabras clave: Biofilm oral, Oxido dialil disulfuro, ortodoncia, enjuague oral, clorhexidina, cetilpiridinio.

Abstract.

Introduction. The use of orthodontic appliance promotes the accumulation of bacterial biofilm, making it necessary to use mouthwashes for its control. Modified diallyl disulfide oxide (ODDM) is an antiseptic solution that could be used as a rinse for orthodontic biofilm control.

Objective. To evaluate the antimicrobial effectiveness of ODDM in biofilm from orthodontic appliance in relation to cetylpyridinium (CPC) mouthwashes and chlorhexidine mouthwash.

Material and methods. We used 13 brackets removed from a patient distributed in 4 groups: Colgate Plax® (CPC/NaF); Oral B® (CPC); Perioxidin® (Chlorhexidine); Accua Aséptic® (ODDM). A bracket was used as a control. The brackets were submerged in the solutions and subsequently placed in thioglycolate broth. The bacterial growth was evaluated every 24 hours for 5 days, using the turbidimetry method. Student t test was used by comparison of independent samples at $\alpha / 2 = 0.05$.

Results. Oral rinses presented the highest rates of colony forming units (CFU), Colgate Plax® reported a growth of $60E7 \pm 22.6E7$ UFC / ml and Oral B®: $36E7 \pm 23.2E7$ UFC / ml. Perioxidin® ($18E7 \pm 15.2E7$ UFC / ml) and Accua Aséptic® ($8E7 \pm 13.7E7$) presented a lower contamination index to the rinses and to the control group ($84E7 \pm 39.1E7$), $P < 0.05$. Accua Aséptic® was equally effective in inhibiting bacterial growth in relation to chlorhexidine mouthwash ($P > 0.05$).

Conclusion. The antimicrobial effect shown by the ODDM makes it an attractive candidate for therapeutic use in orthodontic biofilm control.

1. Introducción.

Actualmente, el tratamiento ortodónico ha ganado una alta popularidad en pacientes que buscan tratamientos de restauración funcional y estética facial, muestra de ello es que durante las últimas dos décadas el número de pacientes se ha duplicado. Según datos de la Asociación Americana de Ortodoncia en los Estados Unidos existen más de cuatro millos de pacientes entre 6 a 18 años y más de un millón de pacientes adultos¹. Sin embargo, a la par de una creciente demanda por el tratamiento ortodónico, de igual manera se ha incrementado la incidencia de enfermedades dentales en pacientes ortodónicos. Esto debido a que la superficie alrededor de los brackets es propicia para la adhesión de bacterias orales y una subsecuente formación de biofilm. A partir de esto, diversos estudios han señalado al tratamiento ortodónico como un factor predisponente para el desarrollo de enfermedades dentales²⁻⁴.

La limpieza mecánica constituye el método más importante para el control de higiene en los pacientes ortodónicos, sin embargo, la falta de cooperación de estos dificulta un control adecuado de la acumulación de biofilm. Adicionalmente existe una variedad de medidas químicas de control de biofilm bacteriano, como pastas dentales, enjuagues, barnices y adhesivos. Sin embargo, soluciones como la clorhexidina y el cloruro de cetilpiridinio han sido asociadas a efectos adversos que impiden su utilización a largo plazo¹. Adicionalmente, el emergente problema de la resistencia bacteriana a antibióticos dificulta el control bacteriano⁵.

Dada esta situación es esencial desarrollar un antimicrobiano efectivo para el control de biofilm bacteriano⁶. El ajo ha sido utilizado como medicamento desde tiempos antiguos, y se ha sido identificado por sus propiedades antibacteriales, antifúngicas y antivirales^{7,8}. Recientemente se ha demostrado el efecto antimicrobiano de amplio espectro del ajo, incluyendo su efectividad contra bacterias orales^{9,10}. El principal compuesto antimicrobiano en el ajo es el óxido dialil disulfuro (ODD) también conocido como Alicina. Este no está presente en el ajo crudo, se forma rápidamente mediante la acción de la enzima, alinasa cuando el ajo es triturado. La alicina reacciona rápidamente con grupos libres de thiol, siendo este su principal mecanismo de acción, a través del cual interactúa con enzimas que contienen thiol, incluyendo cisteína proteasas y alcohol deshidrogenasas, enzimas esenciales en procesos metabólicos de la célula bacteriana, y al ser inhibidas por el ODD produce la muerte de la célula procariota^{7,11}. Se ha demostrado que el ODD es muy inestable, y su producción puede ser inactivada por calor, el cual inhibe la producción de alinasa, previniendo la formación del

óxido dialil disulfuro⁸. Sin embargo en 2000 y 2005, científicos mexicanos estabilizaron la molécula de óxido dialil disulfuro, permitiéndole actuar a largo plazo sin inhibir su efecto antimicrobiano¹¹.

La evidencia previa nos ha llevado a hipotetizar que el ODD es capaz de presentar mayor actividad antimicrobiana en biofilm procedente de aparatología ortodónica en relación a dos enjuagues a base de cloruro de cetilpiridinio y un colutorio a base de clorhexidina.

Si bien existe evidencia de la efectividad del ODD contra bacterias orales, no hay reportes que hayan comparado los efectos de este compuesto con los enjuagues y colutorios actualmente utilizados en el control de biofilm bacteriano oral. Por lo cual, el objetivo del presente estudio es comparar el efecto antimicrobiano entre el óxido dialil disulfuro-modificado y dos enjuagues a base de cloruro de cetilpiridinio y un colutorio a base de clorhexidina en biofilm procedente de aparatología ortodónica.

2. Marco teórico.

2.1 Antecedentes generales.

2.1.1 Biofilm.

Los biofilms consisten en comunidades de microorganismos que se encuentran adheridos a una superficie. Este medio provee un ambiente propicio para el desarrollo de los microorganismos que componen el biofilm bacteriano, esto, para las bacterias dentro del biofilm, supone una serie de ventajas sobre bacterias unicelulares. La principal ventaja que poseen las bacterias dentro del biofilm, es la protección contra la respuesta inmune del huésped así como contra la acción de la mayoría de los antibióticos¹².

Los microorganismos dentro del biofilm, que constituyen 15-25% del volumen del mismo, se encuentran incrustados dentro de una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que representa el grueso del biofilm^{12,13}. Esta matriz extracelular asegura la adhesión a la superficie y la cohesión del biofilm. La matriz extracelular permite la digestión de moléculas extracelulares para la adquisición de nutrientes gracias a una amplia actividad enzimática¹⁴.

2.1.1.1 Formación del biofilm.

La adhesión bacteriana a una superficie sólida es el primer paso en el desarrollo de un biofilm. Dentro de la cavidad oral las bacterias se pueden adherir a diferentes superficies, incluyendo tejidos blandos, película dental adquirida y otras bacterias. La película adquirida, compuesta por una variedad de moléculas del huésped cubre la superficie del esmalte apenas minutos después de la limpieza profesional, esta está constituida por una serie de receptores potenciales, como mucinas, aglutinantes, proteínas ricas en fosfato y enzimas como la amilasa alfa. Estos últimos son receptores de bacterias orales conocidas como colonizadores tempranos, especialmente *Streptococcus viridans*, que además son capaces de coagregarse a una gran variedad de bacterias orales. Estas características permiten a los colonizadores tempranos establecer la placa dental temprana^{15,16}.

Si las condiciones son las adecuadas, los colonizadores primarios multiplican el sustrato en microcolonias. Dentro de las primeras 4 horas de la formación del biofilm podemos identificar, *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus oralis*, que forman el 90% de los *Streptococcus* que conforman el biofilm¹⁷. Sin embargo, 24 horas después, la superficie de una placa más madura muestra la presencia de muchos más tipos de bacterias que forma estructuras complejas en forma de mazorcas¹⁸. Sin embargo, estas bacterias no pueden

adherirse directamente a la superficie del diente, sino que está dado por medio de los colonizadores primarios. Este proceso se llama coagregación, el cual consiste en la unión entre una pareja de bacterias genéticamente distintas¹⁵. La formación de uniones entre las bacterias de la placa dental es altamente específica, los colonizadores primarios pueden coagregarse unos con otros, pero usualmente no con colonizadores secundarios. A pesar de que algunos colonizadores secundarios como la *Porphyromonas gingivalis*, se pueden unir directamente a colonizadores primarios, la mayoría de estos requieren coagregar con el *Fusobacterium nucleatum*, mismo que es considerado un puente entre estos microorganismos, al ser capaz de coagregar con ambos, y en ausencia del cual, muchos colonizadores secundarios no pueden formar parte de la placa dental^{15,19}. Por lo tanto, el rol del *F. nucleatum* es esencial en el desarrollo del biofilm.

2.1.1.2 Conformación patógena del biofilm oral.

La composición del biofilm oral es muy diversa, así como su estructura y espesor en las diferentes superficies de la cavidad oral, por lo que sus características físicas y biológicas son distintas. La placa dental se puede clasificar de acuerdo a su posición en placa supragingival, que se encuentra sobre el margen gingival, y placa subgingival que se encuentra entre el margen gingival y el surco gingival. De igual manera los tipos de bacterias que colonizan cada superficie son diferentes, la superficie del diente está asociada a cocos y bacilos Gram-positivos, mientras la región apical del biofilm se identifica por una presencia predominante de bacilos Gram-positivos²⁰. Dependiendo del tipo de colonización microbiana, el biofilm dental puede adquirir un perfil cariogénico o periodontalmente patógeno.

2.1.1.2.1 Biofilm cariogénico.

La caries dental es la infección oral más comúnmente asociada a la prevalencia del biofilm, y es aun considerada un problema de salud pública mayor en países en desarrollo, afectando la calidad de vida de millones de personas. A pesar de tener una etiología bacterial, esta es una enfermedad multifactorial, y dentro de la cual diferentes factores, incluyendo dieta, huésped, condiciones socioeconómicas, y tiempo, presentan un rol importante en el inicio y progreso de la enfermedad.²¹ La patogenia del biofilm cariogénico está relacionada a la presencia de bacterias capaces de producir grandes cantidades de ácidos orgánicos a partir de la fermentación de carbohidratos, aun en la presencia de un pH muy bajo. Estos microorganismos también tienen la capacidad de producir el complejo polímeros exopolisacaridos que proveen mejores y más fuertes sistemas de adhesión a la

superficie dental, así como polisacáridos intracelulares afines al glicógeno que son usados como reserva de carbohidratos.²²

Existen dos teorías respecto a la etiología de la caries dental. La teoría de la placa no específica establece que la caries es originada por la suma de toda la actividad microbiana del biofilm dental. Por otra parte, la teoría de la placa específica propone que solo unos cuantos microorganismos presentes dentro del complejo oral están involucrados en la caries. A partir de esto, se ha identificado al *Streptococcus mutans* y al *Streptococcus sobrinus* como los principales causales de la caries dental en humanos. Los lactobacilos, microorganismos y ácido gálico y están asociados a la progresión de la enfermedad, mientras especies de *Actinomyces* se encuentran relacionadas a la caries de la superficie radicular²³⁻²⁵.

2.1.1.2.2 Biofilm periodontal.

La gingivitis crónica es inducida por el biofilm dental y se caracteriza por inflamación marginal sin pérdida de adherencia periodontal. Esta es una condición reversible que puede ser fácilmente tratada y prevenida. La periodontitis por otro lado, es una inflamación gingival con migración apical de la unión epitelio sobre la superficie radicular, la cual es seguida de la pérdida de adherencia y reabsorción alveolar²⁶.

Técnicamente todas las formas de enfermedades periodontales son el resultado de interacciones dinámicas del biofilm, respuesta inmune del huésped, y factores genéticos y ambientales. Por lo tanto, la prevalencia de la microbiota periodontal es necesaria pero no suficiente para el establecimiento de las enfermedades periodontales. La patogenia del biofilm periodontal está dado de manera indirecta, a través de la actividad de los factores bacterianos se induce la respuesta inmune del huésped, esto aumenta la producción de mediadores de la inflamación que interfieren con los tejidos óseos y conectivos, provocando la pérdida del periodonto. Por lo tanto, la pérdida de tejidos periodontales es resultado de la respuesta inmunológica del huésped inducida por comunidades microbianas patogénicas²⁷.

A pesar de que el consenso general apunta hacia una etiología periodontal polimicrobiana, actualmente solo tres especies se han considerado como patógenos periodontales: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia*²⁸. A pesar de esto, algunos microorganismos asociados con otras infecciones en el cuerpo humano y nuevas especies de patógenos, pueden tener un rol en la iniciación, progresión, y severidad de las diferentes formas de la enfermedad periodontal^{29,30}.

2.1.1.2.3 Biofilm fúngico.

Aunque las bacterias constituyen el grupo predominante de los microorganismos orales, un gran número de diversos hongos han mostrado ser capaces de colonizar la cavidad de individuos sanos³¹. La candidiasis oral es la infección fúngica más común que afecta la mucosa oral. Las especies de *Candida*, especialmente *Candida albicans*, son microorganismos comensales detectados en el 75% de la cavidad oral de individuos sanos. Sin embargo, en ciertas condiciones estos pueden volverse virulentos y causar enfermedad, incluyendo candidiasis eritematosa, pseudomembranosa e hiperplásica³².

La formación de biofilm fúngicos involucra la adhesión a superficies bióticas y abióticas y producción de matriz extracelular. En infecciones fúngicas, la estructura de los biofilms resultan en una resistencia incrementada a fármacos antifúngicos. La resistencia fúngica a los fármacos es una amenaza importante a la salud oral debido a una limitada cantidad de agentes antifúngicos disponibles en comparación con los antibióticos³³.

2.1.1.3 Resistencia a antibióticos.

Los biofilms han mostrado ser más resistentes contra agentes antimicrobianos en comparación con bacterias planctónicas, de hecho las células existentes en un biofilm, pueden ser hasta 1000 veces más resistentes a agentes antimicrobianos⁵. Diferentes estudios han mostrado que la resistencia a agentes antimicrobianos, es afectada por su estado nutricional, índice de desarrollo, temperatura, pH y una exposición previa a concentraciones de agentes antimicrobianos poco efectivos¹².

2.1.1.3.1 Índice de crecimiento disminuido.

Diferentes estudios han mostrado que un índice de desarrollo lento de los biofilms contribuye a la supervivencia celular contra los antibióticos. Gilbert y colaboradores examinaron los efectos del índice de crecimiento relacionado en condiciones controladas de desarrollo de cultivos planctónicos y biofilms de *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* y *S. epidermidis*³⁴⁻³⁶. Estos estudios, mostraron que la sensibilidad de cultivos de biofilms y bacterias planctónicas expuestas al ciprofloxacino o tobramicina incrementaba con el incremento del índice de desarrollo. Este resultado soporta la idea de que un índice de crecimiento disminuido en los biofilms protege las células de la acción antimicrobiana. Por otro lado, la *P. aeruginosa* con índices disminuidos de desarrollo, tanto en cultivos planctónicos como

de células en biofilm fueron igualmente resistentes al ciprofloxacino. Sin embargo, al incrementar el índice de crecimiento, las células planctónicas se volvieron más susceptibles al ciprofloxacino que las células en el biofilm. A partir de esto se puede pensar que existen otras propiedades del biofilm y no solo el índice de crecimiento influyen en la resistencia al tratamiento antimicrobiano del biofilm³⁴.

2.1.1.3.2 Heterogeneidad.

Cada célula dentro del biofilm experimentara un ambiente ligeramente diferente respecto con las otras células dentro del mismo biofilm, y por lo tanto crecen a diferentes niveles. Esta heterogeneidad es permitida por los gradientes de los nutrientes, gasto de productos, y factores de señalización. La identificación de esta heterogeneidad se puede identificar por medio de la acridina naranja que identifica regiones que contienen células basadas en su contenido de ADN-ARN. Este método ha mostrado diferentes índices de crecimiento en un mismo biofilm³⁷. Existe también evidencia para gradientes de actividad fisiológica en respuesta al tratamiento antimicrobiano. Esto puede verse en el patrón de la actividad respiratoria de la *K. pneumoniae* en un biofilm en respuesta a la monocloramina mostro que las células más cercanas a la interface liquida del biofilm perdieron actividad primero³⁸. De igual manera, cuando las celulas de un biofilm fueron tratadas con fleroxocin, la elongación celular fue observada y fue más extrema en células localizadas cerca al lado expuesto del biofilm³⁹. Estos estudios demuestran que la respuesta a los agentes antimicrobianos pueden variar significativamente, dependiendo de la localización de una célula dentro del biofilm.

2.1.1.3.3 Percepción de quórum.

Las bacterias se comunican por medio de síntesis y reacción en módulos de señalización denominados autoinductores. El termino Percepción de quórum indica que este sistema permite a las bacterias percibir cuando un numero critico de bacterias están presentes en un espacio limitado en el ambiente y responder con la activación de cierto genes, por ejemplo factores de virulencia como enzimas o toxinas⁴⁰. Para *P. aeruginosa*, la percepción de quórum regula la producción de factores virulentos como enzimas extracelulares y lisinas celulares, las cuales son importantes para la patogénesis de infecciones donde sus funciones implican un escudo protector contra fagocitos⁴¹. También se ha observado que la percepción de quórum determina la tolerancia de biofilms de *P. aeruginosa* a la terapia con antibióticos y a la respuesta inflamatoria innata⁴².

2.1.1.3.4 Mutación.

La frecuencia de mutación de un biofilm en crecimiento es significativamente mayor en comparación con células planctónicas en crecimiento ⁴³. La hipermutabilidad de las bacterias promueve el desarrollo de mutaciones que confieren resistencia a los antibióticos, los cuales serán seleccionados de acuerdo a una administración repetitiva de antibióticos ⁴⁴. Por ejemplo, la resistencia a antibióticos betalactámicos está dada por la mutación de los genes reguladores de la producción de betalactamasa ⁴⁵. De igual manera se ha observado que la resistencia al ciprofloxacino de la *P. aeruginosa* está mediada por mutaciones en *gyrA* y alteraciones en algunos sistemas de flujo de salida ⁴⁶.

2.1.1.3.5 Matriz del biofilm.

La matriz de exopolímeros a pesar de no ser por sí misma una barrera significativa contra la difusión de antibióticos, esta tiene ciertas propiedades que pueden retrasar la difusión. Por ejemplo la presencia de enzimas extracelulares como betalactamasas, formaldehído liasa y formaldehído deshidrogenasa pueden concentrarse en la matriz extracelular, desactivando antibióticos cargados positivamente e hidrofílicos. Algunos antibióticos como macrólidos, los cuales están positivamente cargados, pero hidrofóbicos, no se ven afectados por este proceso. Así, la capacidad de la matriz para actuar como una barrera física depende del tipo de antibióticos utilizados, la unión a la matriz y la cantidad en la que son administrados ¹².

2.1.2 Biofilm oral en pacientes ortodóncicos.

La colocación de aparatología fija de metal y polímeros está acompañada de la creación de superficies con propiedades diferentes a los de los tejidos orales. Además, el número de sitios de retención es mucho mayor en pacientes ortodóncicos. Estas características no solo incrementan la cantidad de biofilm, sino que también la prevalencia de bacterias patógenas que pueden provocar caries ⁴⁷ o enfermedades periodontales ⁴⁸. Adicionalmente, los aparatos ortodóncicos reducen la eficacia de las fuerzas naturales de auto limpieza y de la remoción de placa por medio del cepillado dental.

La variedad de superficies creadas por la intervención del tratamiento ortodóncico provee numerosas superficies a las cuales los microorganismos se pueden adherir y formar un biofilm. Por ejemplo la colocación de banda puede inducir la creación de biofilms, aún más que la adhesión, principalmente en el margen gingival, además de inflamación periodontal y formación de puntos blancos en el esmalte ⁴⁹. Sin embargo, las resinas de adhesión de brackets favorecen la adhesión bacteriana ya que

la contracción de la polimerización puede crear un vacío en la interface de contacto donde la bacteria encuentra protección contra la limpieza mecánica y agentes antibacteriales ⁵⁰.

2.1.2.1 Complicaciones provocadas por biofilms durante el tratamiento ortodónico.

2.1.2.1.1 Desmineralización del esmalte.

La desmineralización del esmalte alrededor de los brackets es la consecuencia más común en ortodoncia y puede ir desde manchas blancas en el esmalte hasta la formación de cavidades. Esto puede ocurrir tanto en el lado vestibular como en el lingual, sin embargo la zona de adhesión se ve más afectada creando un importante problema estético ⁵¹. La remineralización de los puntos blancos puede lograrse pasivamente por la saliva o de manera activa por fluoruro o por fosfato de calcio ⁵². Si la remineralización completa ocurre o no está relacionado al tipo de lesiones. Las lesiones blancas se desarrollan rápidamente en los individuos susceptibles dentro del primer mes del tratamiento y pueden permanecer visibles muchos años después de retirar los brackets, e inclusive pueden permanecer permanentemente ⁵³. La micro abrasión es un método invasivo que permite eliminar tejido dañado y permite obtener resultados estéticos en puntos blancos permanentes. Este método también puede favorecer una regresión en lesiones de puntos blancos ⁵².

2.1.2.1.2 Inflamación de tejidos blandos.

La mayor parte de los pacientes ortodónticos presentan algún grado de inflamación de tejidos blandos durante el tratamiento. La gingivitis a menudo es temporal y raramente se convierte en periodontitis durante el tratamiento ortodóntico. Los biofilms en dispositivos de anclaje, como mini tornillos o micro implantes, pueden causar inflamación de los tejidos blandos que les rodean. Estas inflamaciones están asociadas con un incremento del 30% en el índice de fracaso de estos dispositivos ⁵⁴. Adicionalmente, los biofilms formados en las cabezas de los implantes pueden infectar las mucosas creando ulceraciones aftosas e inflamación ⁵⁵.

2.1.2.1.3 Otras consecuencias de biofilms en ortodoncia.

La incidencia de bacteremia causada por trauma durante la colocación o remoción de aparatos ortodónticos fijos y removibles puede verse aumentada debido a un alto índice de biofilm bacteriano ^{56,57}.

Los biofilms también pueden afectar los brackets causando corrosión y picaduras de los materiales metálicos, afectando sus propiedades mecánicas, aumentando la rugosidad en las superficies y afectar la adhesión de las resinas. Esto puede convertirse en un círculo vicioso que permite al biofilm amplificarse por sí mismo y eventualmente comprometer la eficacia de la mecánica del tratamiento ^{58,}
⁵⁹.

2.1.3 Métodos de tratamiento y prevención de biofilm en ortodoncia.

2.1.3.1 Remoción mecánica.

El cepillado mecánico y el uso de cepillos interdetales son aun los más importantes métodos para el control de la higiene oral en los pacientes ortodónticos, en especial la utilización de cepillos manuales con un diseño especial en V en las cerdas, que ha mostrado mucho mayor eficacia que los cepillos convencionales. La evaluación de cepillos eléctricos para la remoción del biofilm ha demostrado tener un efecto de remoción que va mas alla del contacto con las cerdas, es decir sin que exista contacto con biofilm, con distancias registradas de hasta 6mm, dependiendo del cepillo ⁶⁰.

2.1.3.2 Control por medios químicos.

Actualmente existe una amplia variedad de métodos químicos para el control del biofilm, incluyendo la incorporación de antimicrobianos en pastas dentales, enjuagues bucales, barnices y adhesivos. Sin embargo, la clorhexidina permanece como el antimicrobiano más efectivo en la reducción de complicaciones relacionadas al biofilm en pacientes ortodónticos ⁶¹. Aunque la satisfacción puede no ser óptima en muchos pacientes, ya que su uso a largo plazo puede pigmentar los dientes y lengua, así mismo el sentido del gusto puede verse disminuido. Otro antimicrobiano oral efectivo es el Cloruro de cetilpiridinio, pero en muchas formulaciones, su biodisponibilidad es baja. Los beneficios de las pastas dentales y enjuagues bucales que contienen fluoruro para la prevención de caries pueden ayudar a la remineralización del esmalte, esto debido a que el fluoruro actúa neutralizando los ácidos producidos por las bacterias y suprime su crecimiento ⁶². Recientemente, se ha demostrado que el biofilm remante después del cepillado absorbe componentes antibacteriales de los enjuagues utilizados después del cepillado para actuar como reserva para los componentes antibacteriales que son liberados subsecuentemente en concentraciones bioactivas ⁶³.

2.2 Antecedentes específicos.

El ODD o alicina es un compuesto sulfúrico oxigenado, este es identificado como el compuesto responsable de la actividad antimicrobiana del ajo⁶. La alicina no está presente en el ajo en su forma intacta y es producida únicamente cuando el ajo es cortado o triturado. Los daños estructurales activan la alinasa, una enzima que metaboliza la aliina en alicina. Cuando existe un daño estructural en el ajo, las membranas son destruidas, acto seguido la aliina y la alinasa reaccionan de manera inmediata produciendo óxido dialil disulfuro, el cual inactiva el agente invasor. Este mecanismo de defensa solo ocurre en pequeñas áreas y durante un periodo corto de tiempo ya que una producción excesiva de ODD podría dañar a la planta debido a su toxicidad⁷. Esta eficiente organización hace del ODD tenga una vida media muy corta, por lo que, si bien ha mostrado ser un efectivo antimicrobiano *in vitro*, este pierde su eficacia en un tiempo muy corto. Sin embargo, científicos mexicanos lograron estabilizar en Oxido dialil disulfuro, agregando un cofactor que no altera el efecto antimicrobiano de este, logrando obtener un antimicrobiano/antiséptico por contacto, estable, biodegradable, atóxico y con gran espectro de acción¹¹.

2.2.1 Actividad antimicrobiana del Óxido Dialil Disulfuro.

En 1944 Cavallito y Bailey, empleando diferentes métodos de extracción, aislaron e identificaron el componente responsable de la actividad antimicrobiana del ajo, un compuesto de azufre oxigenado que llamó alicina u oxido dialil disulfuro, la cual observaron es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas⁶⁴.

En 1998 Rabinkov y colaboradores confirmaron la capacidad de la alicina a reaccionar con compuestos thiol, atribuyendo así el principal efecto antimicrobiano de la alicina a inhibición de enzimas que contienen thiol las cuales tienen un papel importante en el metabolismo bacteriano⁶⁵. Por ejemplo, Ankri y colaboradores llevaron a cabo un estudio *in vitro*, en el que trofozoítos de *Entamoeba histolytica* suspendidos en 1ml de buffer fosfato salino, fueron expuestos al oxido dialil disulfuro a diferentes concentraciones durante 10 minutos a 37°C, el cual mostró una fuerte inhibición de la actividad de la cisteína proteasa de los trofozoítos⁶⁶. En 1988, Feldber y colaboradores investigaron los efectos del ODD en la síntesis de ADN, ARN y proteínas en *Salmonella typhimurium*. En el cual encontró que el ADN y la síntesis de proteínas pueden ser inhibidas parcialmente por concentraciones bactericidas del ODD (0.2 a--0.5mM), mientras que el efecto en el

ARN fue inmediato, sugiriendo que este podría ser un objetivo primario del mecanismo de acción del óxido dialil disulfuro⁶⁷.

En 2001, Kockar, Oztürk, y Bavbek, estudiaron la efectividad *in vivo* del Oxido Dialil Disulfuro, ácido ascórbico y beta caroteno en 201 pacientes con biopsias positivas en *Helicobacter pylori*. Los pacientes fueron divididos en siete grupos de 30 personas, recibiendo cada uno un tratamiento de 14 días. El primer grupo fue tratado con una terapia estándar de antibióticos (Lansoprazol 30mg b.i.d., claritromicina 500 mg b.i.d., amoxicilina 1g b.i.d.). El segundo grupo recibió el mismo tratamiento con la adición de un suplemento de ácido ascórbico (1000 mg/día). El tercer grupo fue solo tratado con ácido ascórbico (1000 mg/día). El cuarto grupo recibió el tratamiento estándar con antibióticos y adicionalmente beta caroteno (120 mg/día). El quinto grupo fue tratado con solo beta caroteno (120 mg/día). El sexto grupo recibió el tratamiento con antibiótico más un suplemento de alicina (4200 µg/día). El séptimo grupo solo recibió alicina (1200 µg/día). En base a los resultados, se determinó que la alicina puede ser un tratamiento efectivo para infecciones de *Helicobacter pylori*. El tratamiento con alicina condujo a la eliminación de la infección en 27/30 (90%) de los pacientes del sexto grupo y en 7/30 (23%) del séptimo grupo.⁶⁸

En 1999 Yoshida y colaboradores aislaron alicina de aceite de ajo y estudiaron su efecto antimicrobiano y anti fúngico en contra de bacterias Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*) y Gramnegativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Xanthomonas maltophilia* and *Klebsiella pneumoniae*) y hongos (*Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*). La actividad antimicrobiana fue evaluada determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) utilizando un método de micro dilución. Los valores CMI para los cultivos Gram-positivos se encontraron entre 5 y 10 µg/ml de alicina, mientras que para las bacterias Gram-negativas se encontraron entre 15 y 30 µg/ml. Para *Pseudomonas aeruginosa* los valores fueron mucho más altos (>100 µg/ml) que aquellos para el resto de los Gram-positivos evaluados. *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae* mostraron respectivamente concentraciones mínimas inhibitorias de 5 µg/ml y 10 µg/ml.⁶⁹

Otra aplicación potencial para el ODD se puede derivar de los resultados del estudio llevado a cabo por Cutler y Wilson en 2004, el cual sugiere que esta molécula puede ser usada como una alternativa a agentes tópicos como la mupirocina para disminuir la propagación del *Staphylococcus aureus* resistente a la Meticilina. En este estudio los autores evaluaron la actividad antimicrobiana de una alicina acuosa extraída del ajo contra 30 cultivos de *Staphylococcus aureus* resistente a la Meticilina.

La gran mayoría (88%) de los cultivos estudiados mostraron valores de CMI de 16 µg/ml, con todos, con todas las cepas inhibidas a 32 µg/ml. El 88% de las cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la Meticilina tuvieron una concentración mínima bactericida (CMB) de 128 µg/ml, y la eliminación bacteriana total se obtuvo a 256 µg/ml.⁷⁰

En 2007, Cai y colaboradores evaluaron la actividad *in vitro* de óxido dialil disulfuro, tanto de manera individual como en combinaciones con antibióticos; con cefazolin u oxacilina en contra de 20 aislados de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, y con cefoperazona en contra de 31 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando un ensayo de tablero de microdilución. Los resultados de la CMI mostraron que la actividad antimicrobiana en el uso individual del ODD fue baja (CMI 90 > 512 mg/ml), pero esta favoreció la eficacia de los tres β-lactámicos a concentraciones subinhibitorias. Los autores concluyeron que la combinación de ODD y β-lactámicos serán clínicamente prometedoras una vez que la sinergia entre ambos se haya confirmado por estudios experimentales *in vivo*.⁷¹ De igual manera, en 2008, Cai Wang, An Liang y Fang evaluaron la eficacia bactericida *in vitro* de combinaciones del ODD con tobramicina, ciprofloxacino y cefoperazona en contra de *Pseudomonas aeruginosa*, confirmando que el ODD promueve la actividad bactericida de ciertos antibióticos.⁷² An y colaboradores en 2009, observaron que la presencia de ODD también amplifica la actividad fungicida de la anfotericina B, Las CMI *in vitro* del ODD y la anfotericina B fueron determinados en 40 aislados clínicos de *Candida albicans*. Los resultados mostraron que todas las cepas fueron susceptibles a la anfotericina B con índices de CMI 50 fueron de 0.188 a 0.754 µg/ml; la CMI 90 osciló de 0.375 a 1.5 µg/ml y son inhibidas por el ODD con una concentración mínima inhibitoria 50 de 32 a 80 µg/ml; y una CMI 90 de 64 a 128 µg/ml. Una combinación de ambas redujo marcadamente las CMI's (CMI 50 rango de <0.0117-0.0938/1-4 µg /ml; MIC 90 rango <0.0234-0.0938/1-8 µg /ml). Esto indica que existe un efecto sinérgico entre la anfotericina B y el óxido dialil disulfuro.⁷³

Existen pocas referencias en la literatura sobre los efectos del ajo sobre bacterias orales, EN 2005 Bakri y colaboradores, investigaron el efecto antimicrobiano de extractos acuosos del ajo contra 20 especies orales (*Streptococcus mutans*, *S. gordonii*, *S. sanguis*, *S. parasanguis*, *S. mitis*, *S. crista*, *S. oralis*, *S. intermedius*, *S. constellatus*, *S. anginosus*, *Actinomyces naeslundii*, *Enterococcus faecalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Pseudomonas nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Leptotrichia buccalis*, *C. albicans*, y *S. aureus*). El extracto de ajo inhibió el crecimiento de las cepas estudiadas. La CMI y la CMB de las cepas Gram-negativas fueron menores que las cepas de Gram-positivas analizadas (media de la CMI del ODD 4.1 µg /ml y 27.5 µg /ml respectivamente; media de la CMB del ODD 7.9 µg /ml y 91.9 µg /ml

respectivamente)⁹. En 2011, Bcharach y colaboradores probaron la efectividad del ODD en patógenos orales causantes de enfermedad periodontal y caries utilizando el método de dilución en caldo. Las especies Gram-positivas como *S. mutans*, *S. sobrinus* y *Actinomyces oris* fueron inhibidas por una concentración de >600 µg /ml; por otro lado, las especies Gram-negativas como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *F. nucleatum* mostraron sensibilidad a una menor concentración de ODD (CMI: 300 µg /ml). La *Pseudomonas gingivalis* demostró la susceptibilidad más baja del ODD (CMI: 2400 µg /ml). Los investigadores demostraron que el ODD es capaz de inactivar las proteasas del *P. gingivalis* como la lisina-gingipain, la cual presenta un factor de virulencia mayor para esta bacteria y confiere resistencia al oxido dialil disulfuro⁷⁴. En 2012 un estudio llevado a cabo por Velliyagounder y colaboradores confirmo los efectos antimicrobianos sobre el *A. actinomycetemcomitans*. En conclusión, en base a los resultados, los autores sugieren que el ODD puede ser considerado para uso terapéutico en el alivio de la enfermedad periodontal¹⁰.

2.2.2 Actividad inmunoreguladora del Óxido Dialil Disulfuro.

En el año 2000 Hobauer y colaboradores estudiaron la influencia del extracto de ajo en la migración de leucocitos a través de células endoteliales y en neutrófilos aislados. Ambos fueron tratados con extractos de ajo bajo tres concentraciones distintas. Tanto los neutrófilos como las células endoteliales mostraron una significativa reducción en el índice de migración (neutrofilos: $81 \pm 7.7\%$, $p < 0.05$; células endoteliales: $70 \pm 6.7\%$, $p < 0.05$), por lo tanto, el extracto de ajo es identificado como un potente inhibidor de la migración de leucocitos a través de células endoteliales⁷⁵.

En 2004 Sela y colaboradores examinar los efectos *in vitro* del ODD en el funcionamiento de células T en relación a sitios extravasculares inflamados. Encontraron que el ODD actúa sobre la migración de células T mediante la inhibición de la quimosina SDF1 α . Esto significa que el ODD podría tener efectos benéficos en procesos donde las células T presentan un rol importante y esta podría ser utilizada terapéuticamente con enfermedades inflamatorias crónicas⁷⁶.

En 2004 Lang y colaboradores estudiaron el efecto inmunomodulador del ODD en células epiteliales intestinales. Para ello utilizaron células HT-29 y Caco-2 obtenidas de tejido, las cuales una vez cultivadas fueron expuestas a un medio suplementado con oxido dialil disulfuro, y posteriormente estimuladas con la aplicación de TNF- α en una concentración de 200ng/ml. 24 Horas después las células fueron cosechadas y se determinaron las concentraciones de IL-1 β , IP-10, MIG y IL-8 mediante ELISA. Los resultados mostraron que el ODD es capaz de inhibir la secreción inducida por TNF- α de IL-1 β , IL-8, IP-10 y MIG de ambas líneas celulares. Este efecto fue mediado al menos en parte por una

disminución en los niveles de RNA mensajero e involucró la inhibición del $\text{NF}\kappa\beta$ el cual tiene un rol central en la regulación de la transcripción de mediadores pro inflamatorios como citosinas y quimiosinas. Adicionalmente para eliminar la posibilidad de que el efecto inhibitorio del ODD resultase de la inhibición de la proliferación celular o citotoxicidad, se realizaron ensayo de toxicidad MTT y LDH mediante el seguimiento de un cultivo de 30,000 células incubadas con óxido dialil disulfuro, sin que se registrara algún efecto en la viabilidad celular o proliferación, lo cual indico que el efecto del ODD fue mediado por sus efectos intracelulares. Lo observado en el estudio indica que el ODD ejerce un efecto inmunomodulador en las células epiteliales del intestino por lo que el ODD puede tener el potencial de disminuir la inflamación intestinal⁷⁷.

Contrariamente, y dado que el $\text{TNF-}\alpha$ es secretado principalmente por macrófagos, en 2012, Haase y colaboradores realizaron un estudio en el cual investigaron la influencia del ODD en diversas funciones de macrófagos, la producción de monóxido de nitrógeno por la inhibición de óxido nítrico sintasa y la expresión de $\text{TNF-}\alpha$. Para ello utilizaron cultivos de líneas celulares de macrófagos que fueron incubadas en un medio suplementado con ODD con diferentes concentraciones. Para determinar las concentraciones de ODD que son toleradas por las células, se llevaron a cabo un ensayo de viabilidad por medio de la captación de rojo neutro, los cuales fueron comparados a cultivos de *Escherichia coli*. El ODD en concentraciones de hasta $100\mu\text{M}$ no causó mayores efectos citotóxicos mostró una toxicidad similar entre *E. coli* y macrófagos, lo cual podría limitar su uso como un antibiótico sistémico. Sin embargo, demostró un efecto regulador de la función de los macrófagos, disminuyendo la producción de NO sin tener impacto en la explosión oxidativa e incrementando la expresión genética del $\text{TNF-}\alpha$. El efecto en NO ocurre en concentraciones menores que la activación del $\text{TNF-}\alpha$. En base a esto sugirieron que el ODD puede ser utilizado en el tratamiento de enfermedades que involucran iNOS en sus mecanismos patogénicos, tales como arterioesclerosis, enfermedades neurodegenerativas, rechazo de trasplantes o enfermedad inflamatoria intestinal. Por lo que señaló que, si el ODD permanece por debajo de los niveles para para la inducción de citosinas pro inflamatorias, sería posible suprimir la inducción de iNOS, mientras que otras funciones de los macrófagos permanecerían inalteradas⁷⁸.

3. Planteamiento del problema.

La cantidad de pacientes en riesgo de desarrollar complicaciones relacionadas al biofilm ortodónico ha incrementado a la par del éxito comercial de los tratamientos ortodónicos. Según la Asociación Americana de Ortodoncia entre 1982 y 2010 el número de pacientes ortodónticos se duplicó, arrojando una cifra de alrededor de cinco millones de pacientes ortodónticos en los Estados Unidos. De igual manera, estudios han reportado que solo un aproximado del 23% de los pacientes ortodónticos muestra un buen cumplimiento de las indicaciones de higiene oral prescritas por el ortodoncista. Aunado a esto, tomemos en cuenta que alrededor del 60% de los pacientes ortodónticos adquieren una o más complicaciones relacionadas al biofilm como resultado de los tratamientos ortodónticos, de los cuales alrededor del 15% requerirán atención profesional por lesiones severas de descalcificación y cavitaciones en el esmalte¹.

Los biofilms orales son comunidades conformadas por múltiples especies bacterianas suspendidas en una matriz de sustancias extracelulares producidas por ellas mismas. Esta matriz proporciona un ambiente favorable para desarrollar mecanismos de defensa más complejos, fungen como una fuente de nutrientes, y les proporciona estabilidad estructural, así como la adhesión a las superficies dentales. La principal ventaja de los biofilms radica en que permite a las bacterias desarrollar resistencia contra bacteriófagos, respuestas inmunes del huésped, antibióticos e inclusive remoción mecánica, facilitando su proliferación.

El biofilm oral es responsable de las enfermedades dentales más comunes, incluyendo caries, gingivitis y periodontitis. Por lo tanto, el control del biofilm es la meta a lograr para la prevención de enfermedades dentales, siendo los métodos mecánicos de limpieza la manera más confiable de lograr una buena salud oral. Sin embargo, la colocación de aparatos ortodónticos está acompañada por la creación de superficies con propiedades diferentes a las de las superficies naturales de la boca. Adicionalmente, el número de sitios de retención es mucho mayor en los pacientes ortodónticos. Esto conduce a condiciones favorables para el desarrollo de biofilm y eventualmente incrementan la prevalencia de bacterias cariogénicas como el *Streptococcus mutans* y bacterias periodonto patógenas como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Tannerella forsythia*, y *Fusobacterium*. Más aun, dado que la aparatología ortodóntica reduce la efectividad de las fuerzas naturales de limpieza y remoción mecánica del biofilm por medio del cepillado, es difícil

lograr un control adecuado en los pacientes ortodóncicos, especialmente en casos de niños y adolescentes, contribuyendo un aumento en la incidencia de enfermedades dentales¹².

La acumulación de biofilm puede tener como consecuencias tanto afecciones a la salud dental como a la salud en general. El efecto secundario más común en el tratamiento ortodóncico relacionado al biofilm es la desmineralización del esmalte alrededor de los brackets, y puede abarcar desde pequeñas lesiones blancas superficiales, hasta severas cavitaciones que requieren restauraciones. Por otro lado, la retención de biofilm incrementa el riesgo de desarrollar enfermedad periodontal o periimplantitis en el caso de dispositivos de anclaje esquelético, incrementando el índice de fallas de dichos dispositivos. Otra consecuencia de los biofilms ortodóncicos es la bacteriemia ocasionada por trauma durante la remoción de aparatología. La acumulación de biofilm también puede afectar a los dispositivos ortodóncicos y causar corrosión de materiales metálicos, alterar las propiedades mecánicas, alterar la rugosidad o la topografía de los dispositivos y adhesivos; por consiguiente, disminuye la efectividad del tratamiento.

Actualmente existe una amplia variedad de productos para remoción mecánica y el control químico de la formación de biofilm. Los enjuagues orales se han vuelto una prescripción muy común en ortodoncia como coadyuvantes al control mecánico del biofilm. Entre estos la Clorhexidina permanece como el agente antimicrobiano más efectivo en reducir las complicaciones relacionadas al biofilm en pacientes ortodóncicos, sin embargo, su uso en tratamientos a largo plazo está condicionado, debido a que su aplicación por periodos prologados puede causar pigmentación de los dientes y lengua, además de afectar el sentido del gusto. Enjuagues con agentes activos como cloruro de cetilpiridinio y triclosán han demostrado ser efectivos antimicrobianos orales, pero con un efecto bacteriostático mucho menor al efecto bactericida de la clorhexidina. Además, se ha asociado al triclosán con la generación de resistencia en cepas bacterianas y con dermatitis alérgica, mientras que se ha registrado que los enjuagues con cloruro de cetilpiridinio causan pigmentación, sensación de ardor y descamación. Dadas las limitaciones de los agentes antimicrobianos orales actuales es necesaria una terapia alternativa para la prevención del biofilm.

3.1 Pregunta de investigación.

¿Qué efecto antimicrobiano presentará el ODDM en biofilm procedente de aparatología ortodóncica, en relación a dos enjuagues a base de cloruro de cetilpiridinio y un colutorio a base de clorhexidina?

4. Justificación.

Con el surgimiento de la resistencia a antibióticos en las bacterias, existe un considerable interés en el desarrollo de otras clases de antimicrobianos para el control oral de infecciones⁷⁹. El ajo ha sido utilizado como medicina desde tiempos antiguos, así como sus efectos antibacteriales, antimicóticos y antivirales. Recientemente el extracto de ajo ha sido identificado como un agente efectivo en el control del *Staphylococcus aureus*⁷¹. El principal componente antimicrobiano del ajo es un compuesto de sulfuro oxigenado conocido como alicina u oxido dialil disulfuro. Este es formado rápidamente durante la trituración del ajo por medio de la acción de la enzima alinasa sobre el precursor de la alicina, aliina. La alicina por si sola es un producto inestable y sus moléculas tienen una vida media muy corta, por lo cual pierde su eficacia antimicrobiana muy rápidamente⁷. En 2000, investigadores mexicanos, lograron estabilizar la alicina, agregando un cofactor que no modifica la acción antimicrobiana ni el resto de acciones de la alicina, otorgándole una mayor estabilidad molecular, logrando así obtener un efecto antimicrobiano por contacto, estable, biodegradable, atóxico y con gran espectro de acción¹¹.

El ODD reacciona rápidamente con grupos thiol libres, por lo tanto, su principal mecanismo de acción antimicrobiano es a través de la interacción con enzimas que contienen thiol, incluyendo cisteína proteasas y alcohol deshidrogenasa. Ya sea insertando radicales de azufre o causando modificaciones proteicas en las enzimas, este actúa inhibiendo acciones metabólicas del microorganismo causando la muerte de la célula bacteriana¹¹. Su método de acción hace que desarrollar resistencia a la alicina sea 1000 veces menos probable que en otros antibióticos⁶⁵.

La alicina posee un efecto antibacteriano de amplio espectro, incluyendo efectos en *Escherichia*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Clostridium*, *Mycobacterium* y *Helicobacter species*. Además, se ha observado un efecto sinérgico de la alicina en contra del *M. Tuberculosis* con el uso de antibióticos como estreptomina y cloranfenicol. La alicina también ha mostrado tener efectos antimicóticos, como por ejemplo contra *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*, y *Microsporum*. La alicina ha mostrado tener actividad antiviral *in vivo* e *in vitro*. Entre los virus que han mostrado sensibilidad a la alicina están el citomegalovirus humano, Influenza B, herpes simple tipo 1, herpes simple tipo 2, para influenza tipo 3, vaccinia virus, estomatitis vesicular, y rinovirus humano tipo 2.

Adicionalmente, la alicina ha mostrado ser efectiva en reducir el conteo bacteriano y de *Streptococcus mutans* en saliva. Además, ha mostrado ser efectiva en contra de bacterias orales Gram negativas, como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*, dos de los principales patógenos de la enfermedad periodontal^{10, 80}.

La alicina ha mostrado también tener propiedades inmunoreguladoras, inhibiendo PGE2 mediante la supresión de Ciclooxygenasas 2. Además, inhibe la producción de citosinas proinflamatorias y quimiocinas como TNF- α , IL-1 β y MCP-1⁷⁷.

Estas características hacen de la alicina (Oxido dialil disulfuro), un candidato atractivo para ser utilizado como agente terapéutico en el control de biofilm bacteriano en pacientes ortodóncicos.

5. Hipótesis.

5.1 Hipótesis de trabajo.

La solución enzimática a base de ODD presentará mayor actividad antimicrobiana en biofilm procedente de aparatología ortodónica en relación a dos enjuagues a base de cloruro de cetilpiridinio y un colutorio a base de clorhexidina.

- A) Solución enzimática a base de Óxido Dialil Disulfuro.
- B) Enjuague a base de Fluoruro de sodio y Cloruro de cetilpiridinio.
- C) Enjuague a base de Cloruro de cetilpiridinio.
- D) Colutorio a base de Clorhexidina al 0.12%.

$H_1: A \neq B, C, D.$

5.2 Hipótesis nula.

La solución enzimática a base de ODD presentará una actividad antimicrobiana similar en biofilm procedente de aparatología ortodónica en relación a dos enjuagues a base de cloruro de cetilpiridinio y un colutorio a base de clorhexidina.

$H_0: A = B = C = D.$

6. Objetivos.

6.1 Objetivo general.

Comparar el efecto antimicrobiano entre el óxido dialil disulfuro-modificado y dos enjuagues a base de cloruro de cetilpiridinio y un colutorio a base de clorhexidina en biofilm procedente de aparatología ortodónica.

6.2 Objetivos específicos.

1. Recolectar brackets de un paciente que ha finalizado su tratamiento de ortodoncia.
2. Establecer ensayos de pruebas de inmersión de los brackets en las soluciones antisépticas a diferentes tiempos de exposición.
3. Evaluar el grado de desinfección de los brackets a través del conteo bacteriano (UFC/ml) en medios de cultivo de caldo tioglicolato, utilizando la técnica de turbidez.
4. Comparar el efecto antimicrobiano del ODD en relación a dos enjuagues a base de cloruro de cetilpiridinio y un colutorio a base de clorhexidina.
5. Comprobar si el tiempo de exposición afecta la efectividad de las soluciones químicas desinfectantes.
6. Identificación de bacterias de los cultivos por tinción de Gram.
7. Analizar la topografía de los brackets por Microscopia electrónica de barrido (M. E. B.), para evaluar cualitativamente la formación de biofilm y daños superficiales.

7. Material y métodos.

7.1 Universo de estudio.

13 Brackets de un paciente que había finalizado su tratamiento y se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos (G) con una n=3: G1-Colgate Plax® (Cloruro de cetilpiridinio/Fluoruro de sodio); G2- Oral B® (Cloruro de cetilpiridinio); G3- Peroxidín® (Clorhexidina 0.12%); G4-Accua Aséptic® (ODDM).

7.2 Tipo de estudio.

Investigación experimental, comparativa y longitudinal.

7.3 Criterios de elegibilidad.

7.3.1 Criterios de inclusión.

- Brackets Alexander 0.18 provenientes de un paciente que finalizo Tratamiento ortodontico.
- Soluciones químicas desinfectantes. Colgate Plax sin alcohol (Fluoruro de sodio 0.05%, Cloruro de cetilpiridinio 0.075%), Oral B Pro-salud (Cloruro de cetilpiridinio 0.07%), Accua Aséptic (Oxido dialil disulfuro modificado 0.008g), Peroxidín (Clorhexidina Digluconato 0.12%).

7.3.2 Criterios de exclusión.

- Tubos de molares.

7.4 Operación de variables.

7.4.1 Variables dependientes.

- Crecimiento bacteriano.

7.4.2 Variables independientes.

- Soluciones químicas desinfectantes.
- Tiempos de exposición.

7.5 Materiales.

- Colgate Plax sin alcohol (Fluoruro de sodio 0.05%, Cloruro de cetilpiridio 0.075%).
- Oral B Pro-salud (Cloruro de cetilpiridio 0.07%).
- Accua Aséptic (Óxido dialil disulfuro modificado 0.008g).
- Perioxidin (Clorhexidina Digluconato 0.12%).
- Tubos de ensayo.
- Pinzas de curación.
- Micropipeta.
- Campos estériles.
- Mecheros de alcohol.
- Gasas estériles.

7.6 Metodología.

7.6.1 Etapa 1: Recolección de muestra.

Se retiraron los brackets de un paciente que finalizó su tratamiento ortodóncico y fueron colocado es campos estériles.



Fig. 1 Retiro de aparatología fija.



Fig. 2. Brackets Alexander 0.18, retirados de un único paciente.

VALORACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ÓXIDO DIALIL DISULFURO-MODIFICADO EN BIOFILM PROCEDENTE DE APARATOLOGÍA ORTODÓNICA

Posteriormente estos fueron distribuidos de manera aleatoria en 4 grupos experimentales, de acuerdo a la solución química desinfectante a la que serían expuestos, y se utilizó un bracket como grupo control.



Fig. 3 Distribución de grupos experimentales (n=3).

7.6.2 Etapa 2: Pruebas de inmersión.

Los brackets fueron sometidos a pruebas de inmersión en cada una de las soluciones antisépticas a diferentes tiempos de exposición: 1, 3, y 5 min.

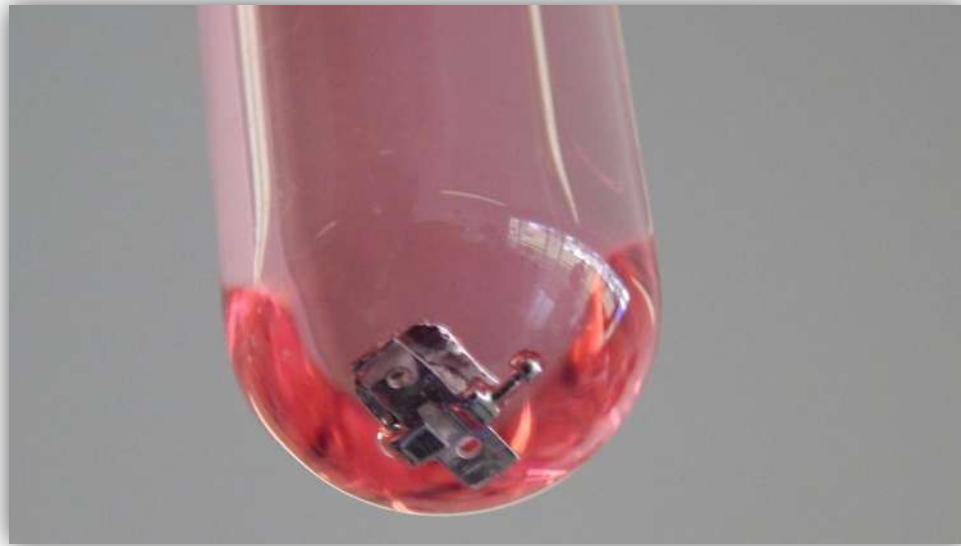


Fig. 4 Pruebas de inmersión.

7.6.3 Etapa 3: Evaluación de crecimiento bacteriano.

Los brackets fueron colocados de manera individual en tubos de ensayo con 3ml de caldo tioglicolato durante 5 días a una temperatura de 37° C para simular la temperatura de boca.

VALORACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ÓXIDO DIALIL DISULFURO-MODIFICADO EN BIOFILM PROCEDENTE DE APARATOLOGÍA ORTODÓNICA



Fig. 5 Medios de cultivo caldo tioglicolato incubados a 37°C.

Posteriormente el crecimiento bacteriano de los cultivos fue cuantificado visualmente utilizando estándares de turbidez de McFarland (BaSO_4) para determinar las unidades formadoras de colonias bacterianas (UFC/ml).

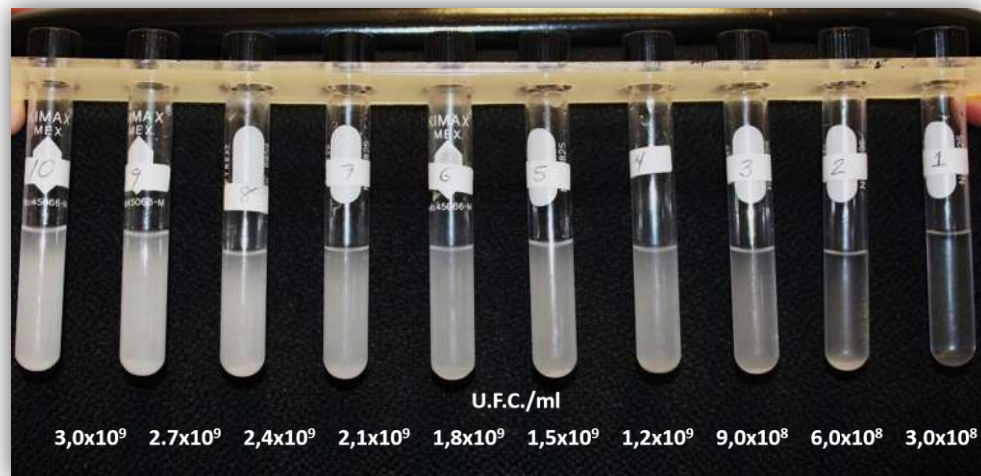


Fig. 6 Estándar de McFarland (BaSO_4).



Fig. 7 Evaluación visual del crecimiento bacteriano.

7.6.4 Etapa 4: Identificación de bacterias por tinción de Gram.

Se recogió la muestra de los tubos de ensayo con un asa bacteriológica sobre un porta muestras, mismas que fueron fijadas con el mechero. Posteriormente se agregó violeta de genciana durante un minuto, para después ser enjuagadas con agua bidestilada de manera indirecta. Se agregó lugol y un minuto después alcohol y acetona. Finalmente fueron enjuagadas con agua y llevadas al microscopio óptico.



Fig. 8. Tinción de Gram.

7.6.5 Análisis topográfico de los brackets por Microscopia Electrónica.

Los brackets fueron retirados de los medios de cultivo. La mitad de ellos fueron limpiados utilizando hipoclorito de sodio para la remoción del biofilm y cálculos en la superficie para observar posibles daños causados por el biofilm. El resto de los brackets no se sometieron a ningún método de sanitización. Los brackets que no fueron sanitizados fueron metalizados ya que el biofilm y cálculo dental sobre la superficie no es conductor. Ambos grupos de brackets fueron fijados en una portaobjetos, junto a un bracket nuevo de la misma prescripción. Posteriormente fueron llevados al desecador durante 8 días. Finalmente, los brackets fueron llevados al microscopio electrónico de barrido (M. E. B.).

VALORACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ÓXIDO DIALIL DISULFURO-MODIFICADO EN BIOFILM PROCEDENTE DE APARATOLOGÍA ORTODÓNICA



Fig. 9 Análisis topográfico de los brackets por M.E.B.

7.7 Análisis bioestadístico.

Para validar los resultados de la evaluación de crecimiento bacteriano se utilizó t student por comparación de medias individuales a $\alpha/2=0.05$ para comparar los valores de crecimiento bacteriano. Para el procesamiento de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 24.0.

8. Resultados.

8.1 Grupo control.

8.1.1 Registro de crecimiento bacteriano.

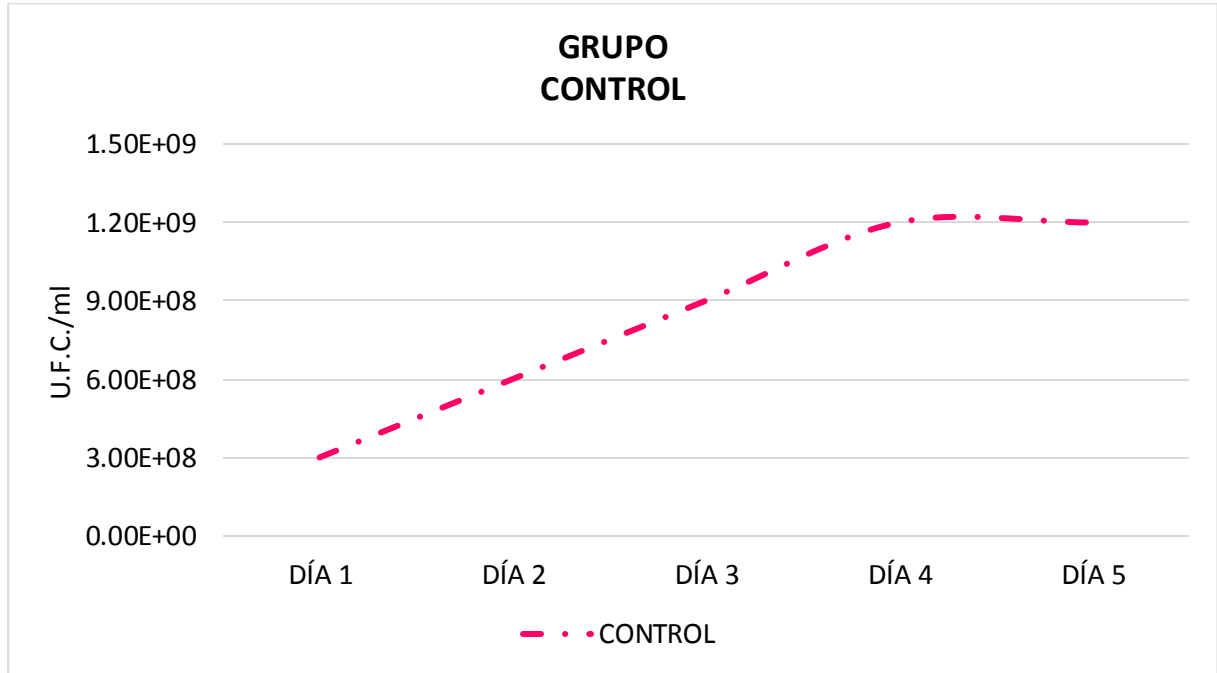


Fig. 10 El primer registro realizado a las 24 horas mostró un crecimiento de $3E08$, por lo que el periodo de latencia fue muy corto para haber sido registrado. Durante los días 1, 2 y 3 se observó un crecimiento exponencial hasta registrar, en el día 4 y 5, una concentración de células constante ($1.2E09$), alcanzando la fase estacionaria del crecimiento bacteriano.



Fig. 11 Cultivo del grupo control en el 5º día ($1.2E09$ U.F.C./ml).

8.1.2 Análisis bioestadístico.

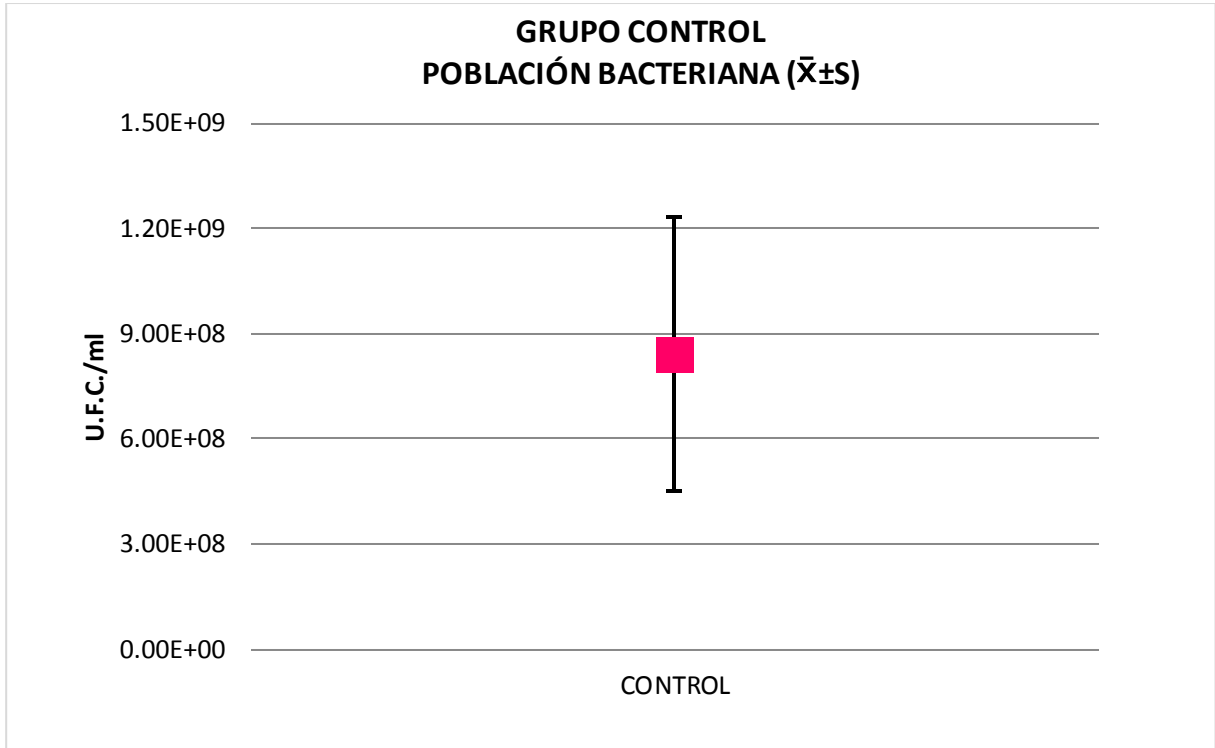


Fig. 12 EL grupo control mostró una media de $8.4E8 \pm 3.91E8$ U.F.C./ml.

8.2 Grupo 1 (Colgate).

8.2.1 Registro de crecimiento bacteriano.

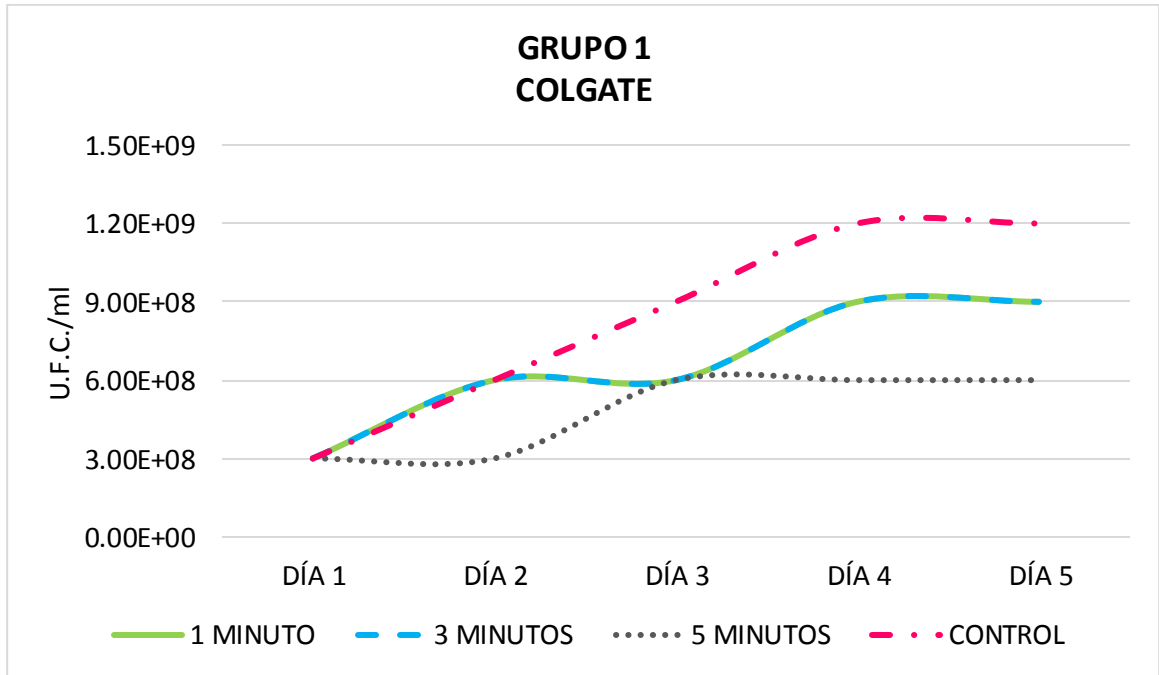


Fig. 13 Los cultivos correspondientes a las exposiciones de 1 minuto y 3 minutos presentaron un crecimiento exponencial mayor al cultivo de 5 minutos. De igual manera alcanzaron una mayor concentración de U.F.C./ml al quinto día.



Fig. 14 Crecimiento bacteriano en el 5° día. De izquierda a derecha: cultivo de exposición de 1 minuto (9E08 U.F.C./ml); cultivo de exposición de 3 minutos (9E08 U.F.C./ml); cultivo de exposición de 5 minutos (6E08 U.F.C./ml).

8.2.2 Análisis bioestadístico.

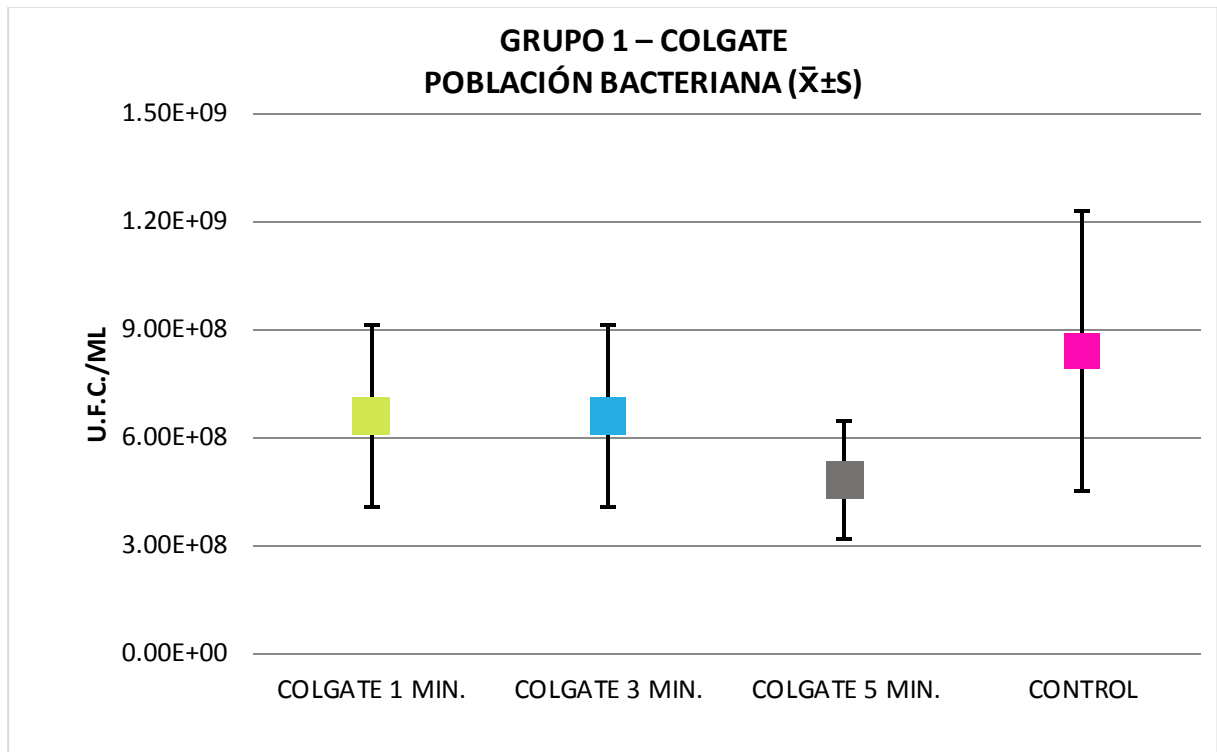


Fig. 15 Media de población bacteriana. Los grupos de Colgate 1 min. y Colgate 2 min. mostraron la media de población bacteriana más alta ($6.6E08 \pm 2.51E08$ U.F.C./ml), mientras que Colgate 5 min. mostró una media de población bacteriana menor ($4.8E08 \pm 1.64E08$ U.F.C./ml). Sin embargo, no existió diferencia significativa entre los grupos, ni respecto al grupo control ($P > 0.05$).

Tabla 1 Prueba t de muestras independientes.

Solución química	N	$\bar{x} \pm s$ (U.F.C./ml)	\pm (U.F.C./ml)	P
Colgate 1 min.	5	6.6E08	2.51E08	1.000
Colgate 3 min.	5	6.6E08	2.51E08	
Colgate 1 min.	5	6.6E08	2.51E08	0.217
Colgate 5 min.	5	4.8E08	1.64E08	
Colgate 3 min.	5	6.6E08	2.51E08	0.217
Colgate 5 min.	5	4.8E08	1.64E08	

VALORACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ÓXIDO DIALIL DISULFURO-MODIFICADO EN BIOFILM PROCEDENTE DE APARATOLOGÍA ORTODÓNICA

<i>Colgate 1 min.</i>	5	6.6E08	2.51E08	0.412
<i>Control</i>	5	8.4E08	3.91E08	
<i>Colgate 3 min</i>	5	6.6E08	2.51E08	0.412
<i>Control</i>	5	8.4E08	3.91E08	
<i>Colgate 5 min.</i>	5	4.8E08	1.64E08	0.94
<i>Control</i>	5	8.4E08	3.91E08	

8.3 Grupo 2 (Oral B).

8.3.1 Registro de crecimiento bacteriano.

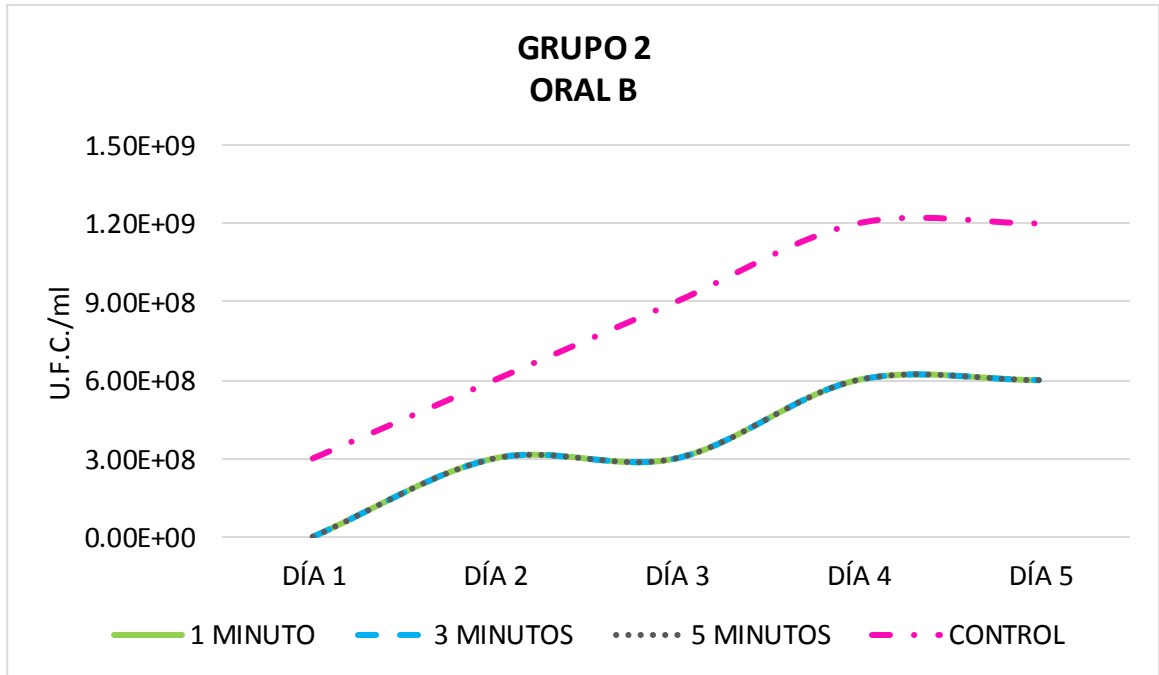


Fig. 16 Los tres cultivos presentaron la misma una curva de crecimiento bacteriano. A diferencia del grupo control se observó un periodo de latencia hasta el segundo día, registrándose el primer nivel de la escala de McFarland ($3E08$ U.F.C./ml). El máximo crecimiento bacteriano registrado al 5° día fue de $6E08$ U.F.C./ml.



Fig. 17 Crecimiento bacteriano en el 5° día. De izquierda a derecha: cultivo de exposición de 1 minuto ($6E08$ U.F.C./ml); cultivo de exposición de 3 minutos ($6E08$ U.F.C./ml); cultivo de exposición de 5 minutos ($6E08$ U.F.C./ml).

8.3.2 Análisis bioestadístico.

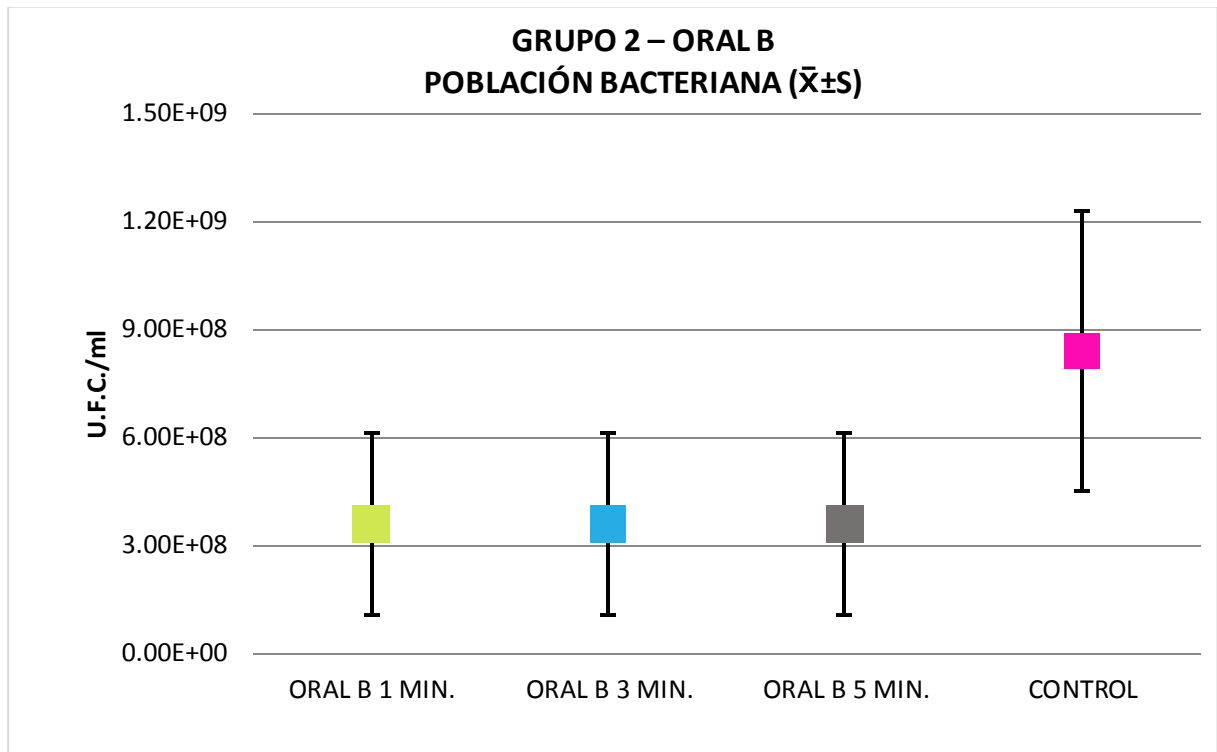


Fig. 18 Los tres cultivos expuestos a Oral-B mostraron la misma media de población bacteriana (3.6E08 U.F.C./ml), las cuales fueron significativamente diferentes el grupo control (P=0.05).

Tabla 2 Prueba t de muestras independientes

Solución química	N	$\bar{x} \pm S$ (U.F.C./ml)	\pm (U.F.C./ml)	P
Oral-B 1 min.	5	3.6E08	2.51E08	1.000
Oral-B 3 min.	5	3.6E08	2.51E08	
Oral-B 1 min.	5	3.6E08	2.51E08	1.000
Oral-B 5 min.	5	3.6E08	2.51E08	
Oral-B 3 min.	5	3.6E08	2.51E08	1.000
Oral-B 5 min.	5	3.6E08	2.51E08	

VALORACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ÓXIDO DIALIL DISULFURO-MODIFICADO EN BIOFILM PROCEDENTE DE APARATOLOGÍA ORTODÓNICA

<i>Oral-B 1 min.</i>	5	3.6E08	2.51E08	0.05
<i>Control</i>	5	8.4E08	3.91E08	
<i>Oral-B 3 min.</i>	5	3.6E08	2.51E08	0.05
<i>Control</i>	5	8.4E08	3.91E08	
<i>Oral-B 5 min.</i>	5	3.6E08	2.51E08	0.05
<i>Control</i>	5	8.4E08	3.91E08	

8.4 Grupo 3 (Clorhexidina).

8.4.1 Registro de crecimiento bacteriano.

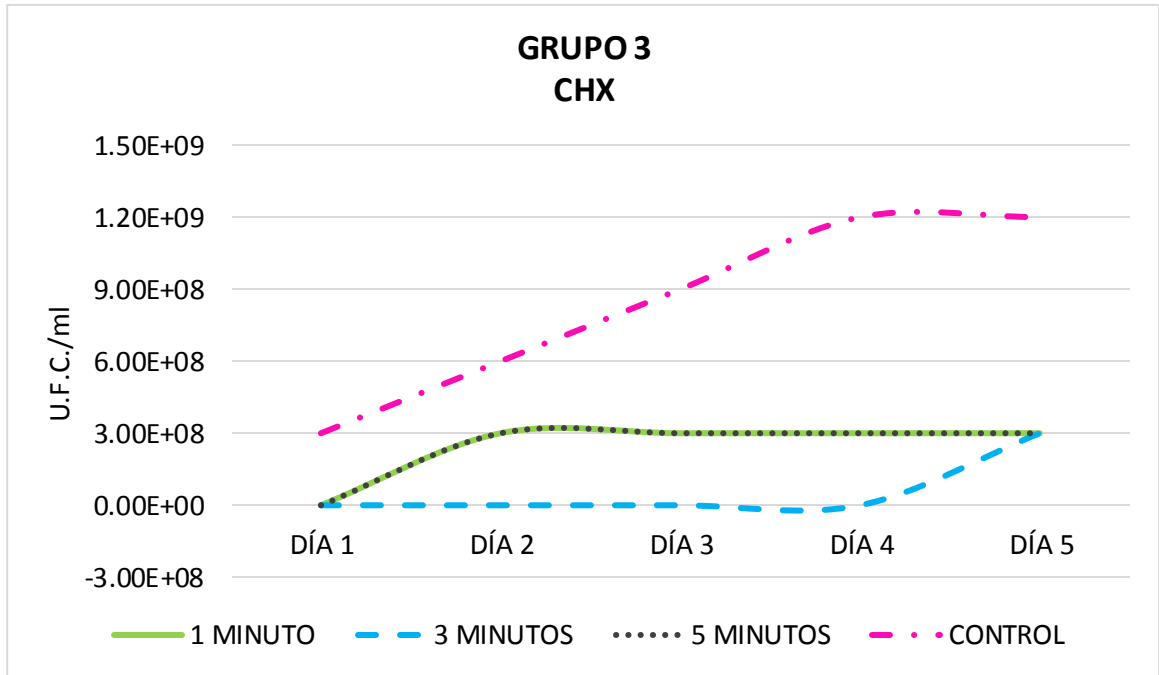


Fig. 19 Los cultivos expuestos a 1 minuto y 5 minutos presentaron la misma curva de crecimiento bacteriano, con un periodo de latencia que se extendió hasta el segundo día, donde alcanzó su máximo crecimiento ($3E08$ U.F.C./ml). El cultivo expuesto a 5 minutos mostró una latencia prolongada hasta el 5 día, donde alcanzó la primera escala de McFarland ($3E08$ U.F.C./ml).



Fig. 20 Crecimiento bacteriano en el 5° día. De izquierda a derecha: cultivo de exposición de 1 minuto ($3E08$ U.F.C./ml); cultivo de exposición de 3 minutos ($3E08$ U.F.C./ml); cultivo de exposición de 5 minutos ($3E08$ U.F.C./ml).

8.4.2 Análisis bioestadístico.

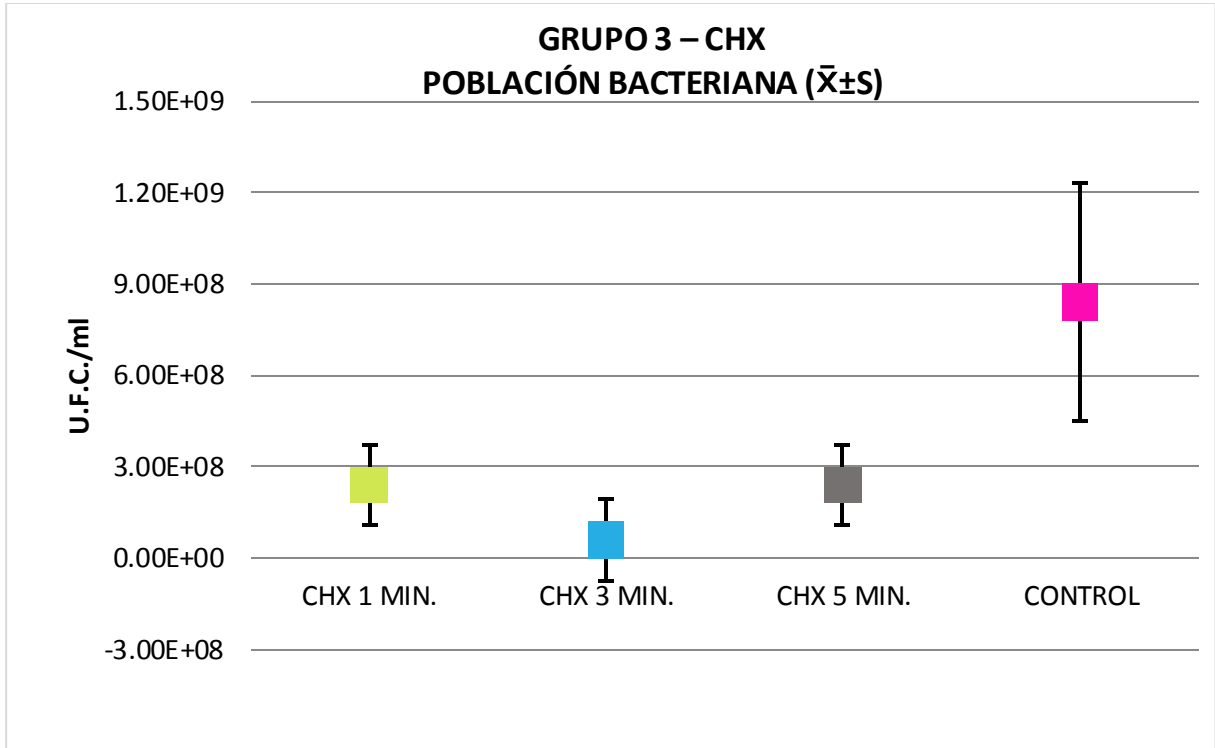


Fig. 21 Los cultivos expuestos a 1 y 5 minutos presentaron la misma media de población ($2.4E08 \pm 1.34E08$ U.F.C./ml), el cultivo correspondiente a los 3 minutos presentó una media de población bacteriana de $6E07 \pm 1.34E08$ U.F.C./ml. Sin embargo, no existió diferencia significativa entre los tiempos de exposición ($P > 0.05$), no así del grupo control cuya media de población bacteriana fue significativamente mayor del resto de los cultivos ($P < 0.05$).

Tabla 3 Prueba t de muestras independientes.

Solución química	N	$\bar{x} \pm S$ (U.F.C./ml)	\pm (U.F.C./ml)	P
CHX 1 min.	5	2.4E08	1.34E08	0.067
CHX 3 min.	5	6E07	1.34E08	
CHX 1 min.	5	2.4E08	1.34E08	1.000
CHX 5 min.	5	2.4E08	1.34E08	
CHX 3 min.	5	6E07	1.34E08	0.067
CHX 5 min.	5	2.4E08	1.34E08	

VALORACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ÓXIDO DIALIL DISULFURO-MODIFICADO EN BIOFILM PROCEDENTE DE APARATOLOGÍA ORTODÓNICA

<i>CHX 1 min.</i>	5	2.4E08	1.34E08	0.012
<i>Control</i>	5	8.4E08	3.91E08	
<i>CHX 3 min.</i>	5	6E07	1.34E08	0.003
<i>Control</i>	5	8.4E08	3.91E08	
<i>CHX 5 min.</i>	5	2.4E08	1.34E08	0.012
<i>Control</i>	5	8.4E08	3.91E08	

8.5 Grupo 4 (ODD-M).

8.5.1 Registro de crecimiento bacteriano.

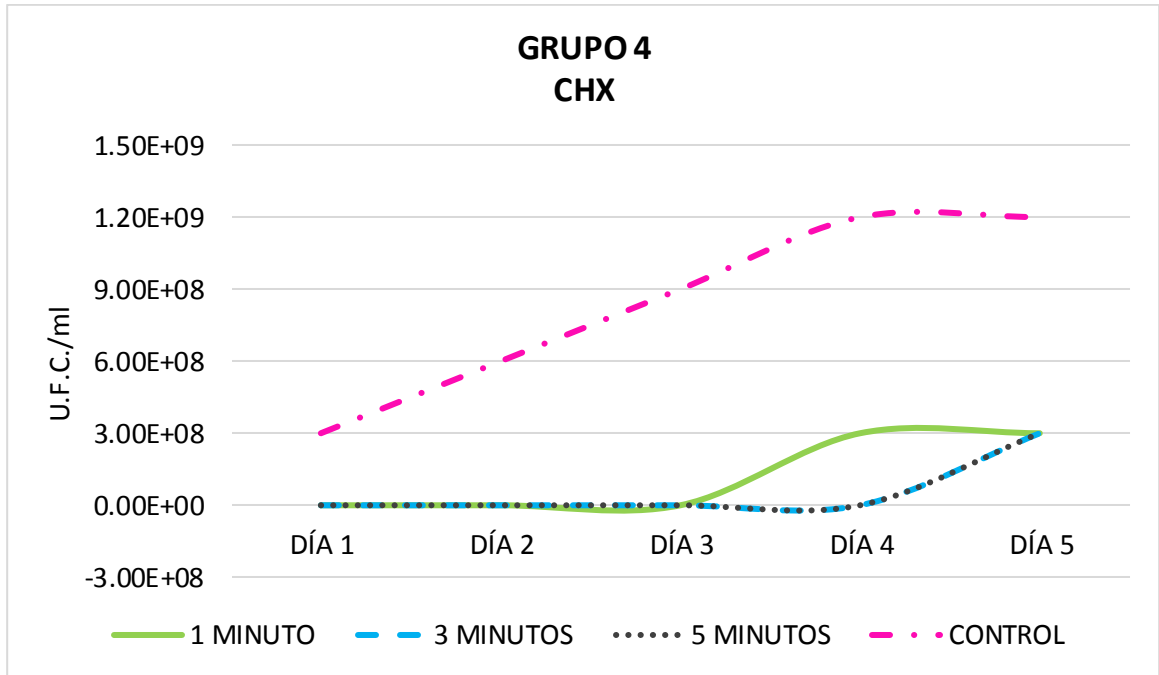


Fig. 22 Los grupos expuestos a 3 y 5 minutos presentaron el periodo de latencia más largo, alcanzando una población bacteriana de $3E08$ U.F.C./ml hasta el 5 día. El cultivo de 1 minuto alcanzó la misma población bacteriana el 4° día, siendo esta la máxima concentración bacteriana de ambos grupos.

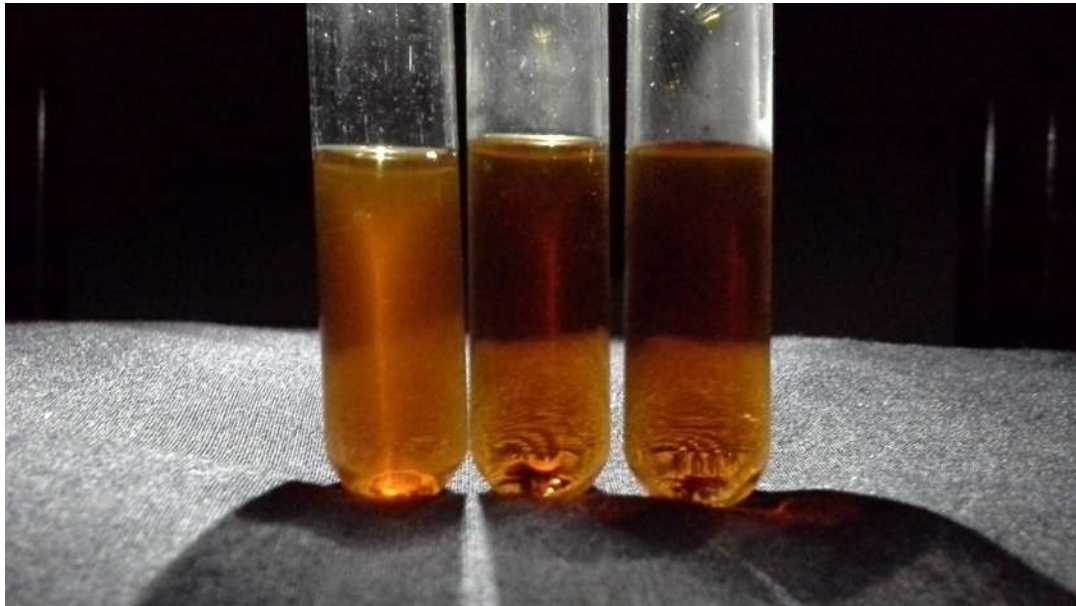


Ilustración 23 Crecimiento bacteriano en el 5° día. De izquierda a derecha: cultivo de exposición de 1 minuto ($3E08$ U.F.C./ml); cultivo de exposición de 3 minutos ($3E08$ U.F.C./ml); cultivo de exposición de 5 minutos ($3E08$ U.F.C./ml).

8.5.2 Análisis bioestadístico.

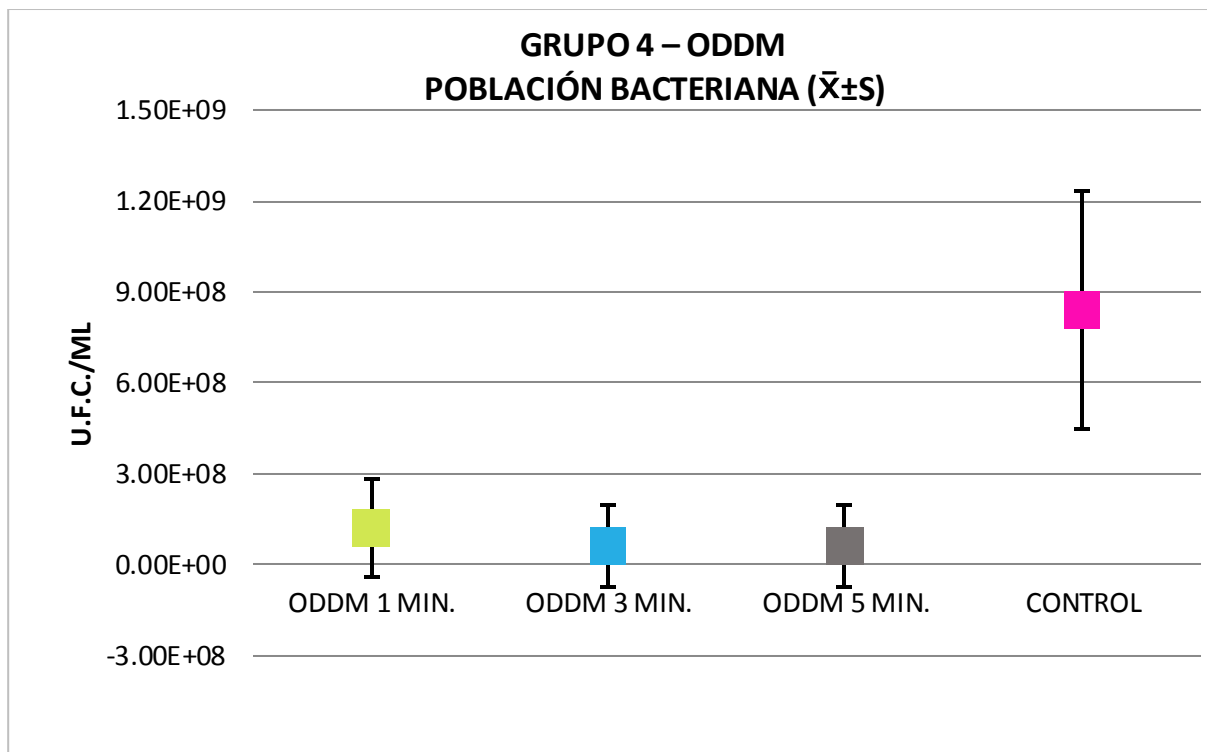


Fig. 24 El cultivo expuesto a un 1 minuto presentó una media de población bacteriana de $1.2E08 \pm 1.64E08$ U.F.C./ml, mientras que los cultivos de 3 y 5 minutos de exposición presentaron una media de $6E07 \pm 1.34E08$ U.F.C./ml, sin embargo, no existió una diferencia significativa entre los cultivos ($P > 0.05$). Todos los cultivos expuestos a ODD-M presentaron una diferencia significativa respecto del grupo control ($P < 0.05$).

Tabla 4 Prueba t de muestras independientes.

Solución química	N	$\bar{x} \pm S$ (U.F.C./ml)	\pm (U.F.C./ml)	P
ODD-M 1 min.	5	1.2E08	1.64E08	0.545
ODD-M 3 min.	5	6E07	1.34E08	
ODD-M 1 min.	5	1.2E08	1.64E08	0.545
ODD-M 5 min.	5	6E07	1.34E08	
ODD-M 3 min.	5	6E07	1.34E08	1.000
ODD-M 5 min.	5	6E07	1.34E08	

VALORACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ÓXIDO DIALIL DISULFURO-MODIFICADO EN BIOFILM PROCEDENTE DE APARATOLOGÍA ORTODÓNICA

<i>ODD-M 1 min.</i>	5	1.2E08	1.64E08	0.005
<i>Control</i>	5	8.4E08	3.91E08	
<i>ODD-M 3 min.</i>	5	6E07	1.34E08	0.003
<i>Control</i>	5	8.4E08	3.91E08	
<i>ODD-M 5 min.</i>	5	6E07	1.34E08	0.003
<i>Control</i>	5	8.4E08	3.91E08	

8.6 Evaluación de crecimiento bacteriano entre grupos.

8.6.1 Registro de crecimiento bacteriano.

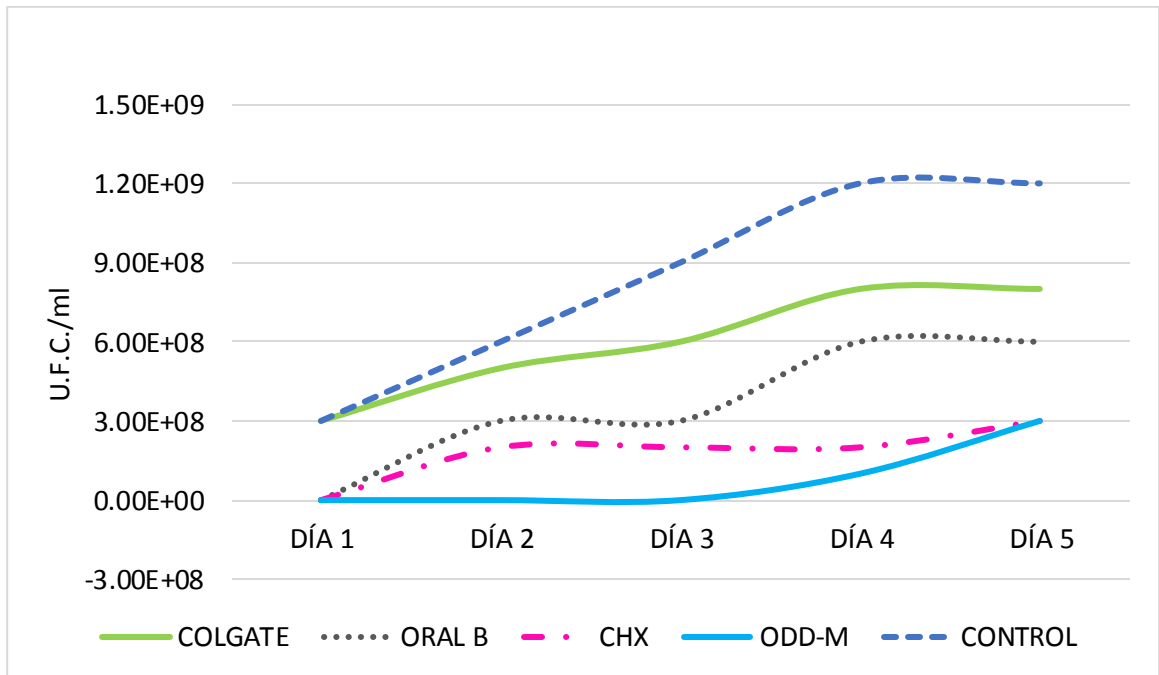


Fig. 25 El grupo control mostró corto periodo de latencia y el crecimiento exponencial más constante, con $3E08$ U.F.C./ml por día, hasta el cuarto día donde alcanzó la fase estacionaria, con una población bacteriana de $1.2E09$ U.F.C./ml. EL grupo de Colgate obtuvo un periodo de latencia igual al grupo control, sin embargo, el crecimiento mostró se menos constante durante la fase de crecimiento exponencial, alcanzando un máximo de crecimiento bacteriano el 4° día con $8E08$ U.F.C./ml. EL grupo de Oral B mostró un periodo de latencia que se prolongó hasta el segundo día con una población bacteriana de $3E08$ U.F.C./ml, y alcanzó el máximo crecimiento en el 4° día con $6E08$ U.F.C./ml. EL grupo de Clorhexidina mostro un periodo de latencia de 48 horas, mostrando $2E08$ U.F.C./ml, y alcanzando la máxima concentración bacteriana de $3E08$ U.F.C./ml durante el 5° día. El grupo de ODD-M mostró el periodo de latencia más largo, mostrando el primer registro de crecimiento en el 4 día con $1E08$ U.F.C./ml, y alcanzando el máximo de $5E08$ U.F.C./ml en el 5° día.

8.6.2 Análisis bioestadístico.

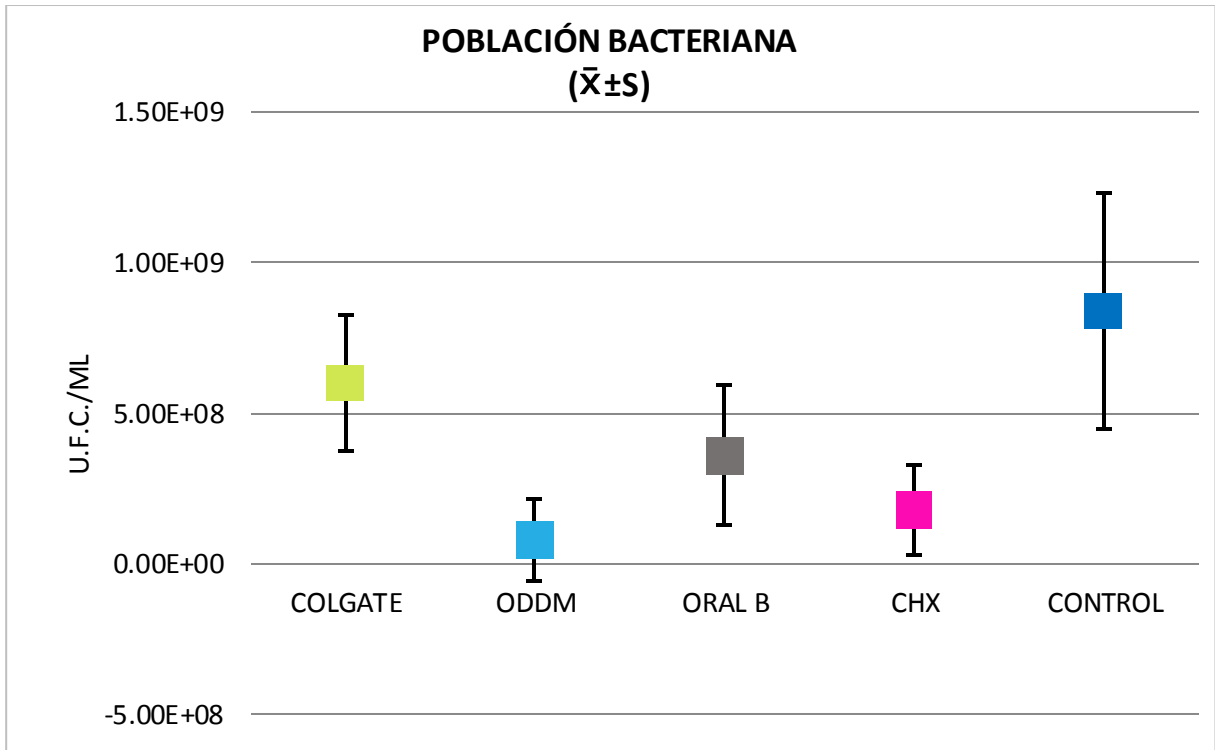


Fig. 26 Los enjuagues bucales presentaron los mayores índices de unidades formadoras de colonias (UFC), el grupo de Colgate reportó un crecimiento de $60E7 \pm 22.7E7$ UFC/ml y Oral B de $36E7 \pm 23.2E7$ UFC/ml. El grupo de Clorhexidina ($18E7 \pm 15.2E7$ UFC/ml) y ODD-M ($8E7 \pm 13.7E7$) presentaron un índice de contaminación menor a los enjuagues y al grupo control ($84E7 \pm 39.1E7$), $P < 0.05$. El grupo de ODD-M mostró ser igualmente efectivo en la inhibición del crecimiento bacteriano en relación al colutorio de clorhexidina ($P > 0.05$).

Tabla 5 Prueba t de muestras independientes.

Solución química	N	$\bar{X} \pm S$ (U.F.C./ml)	\pm (U.F.C./ml)	P
Colgate	15	60E07	22.7E07	0.000
ODD-M	15	8E07	13.7E07	
Colgate	15	60E07	22.7E07	0.008
Oral B	15	36E07	23.2E07	
Colgate	15	60E07	22.7E07	0.000
CHX	15	18E7	15.2E7	

VALORACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ÓXIDO DIALIL DISULFURO-MODIFICADO EN BIOFILM PROCEDENTE DE APARATOLOGÍA ORTODÓNICA

<i>Colgate</i>	15	60E07	22.7E07	0.105
<i>Control</i>	5	84E07	3.91E08	
<i>ODD-M</i>	15	8E07	13.7E07	0.000
<i>Oral B</i>	15	36E07	23.2E07	
<i>ODD-M</i>	15	8E07	13.7E07	0.069
<i>CHX</i>	15	18E7	15.2E7	
<i>ODD-M</i>	15	8E07	13.7E07	0.000
<i>Control</i>	5	84E07	3.91E08	
<i>Oral B</i>	15	36E07	23.2E07	0.018
<i>CHX</i>	15	18E7	15.2E7	
<i>CHX</i>	15	18E7	15.2E7	0.000
<i>Control</i>	5	84E07	3.91E08	

8.7 Identificación de bacterias por tinción de Gram.

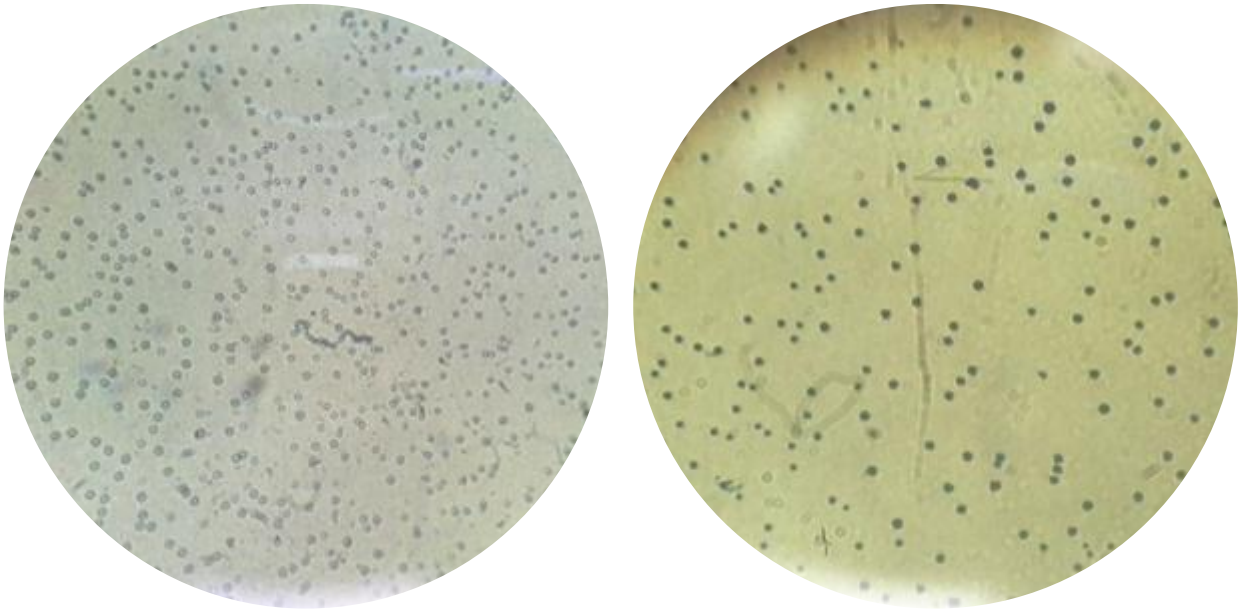


Fig. 27 Micrografías de cocos Gram positivos (Objetivos de 40x y 100x).

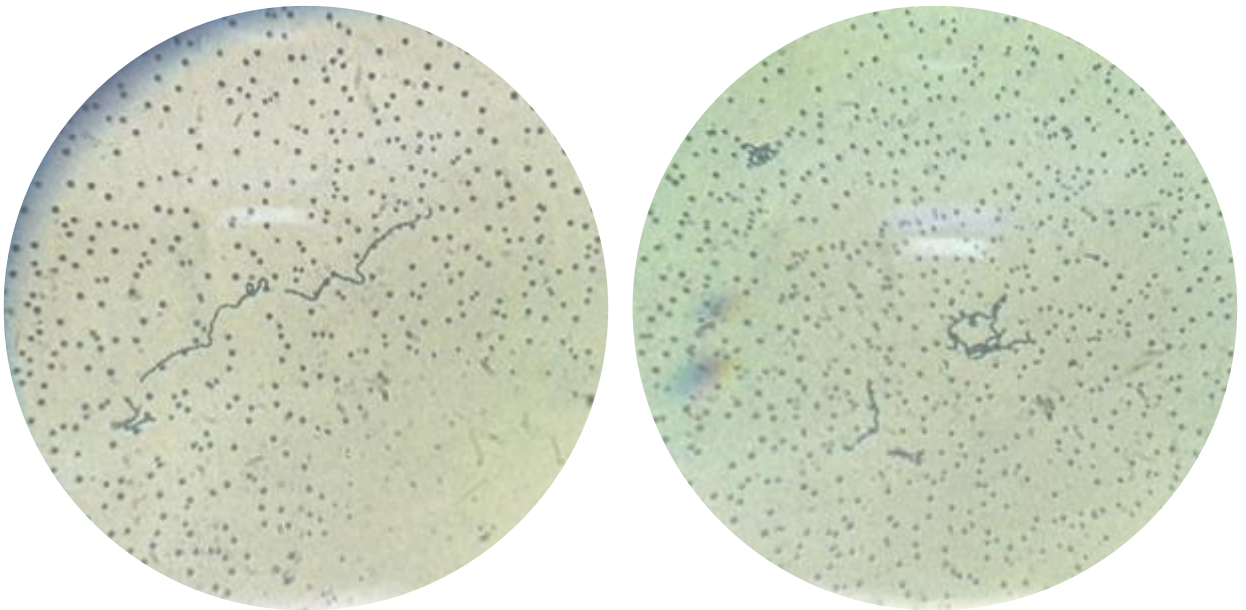


Fig. 28 Micrografías de estreptococos Gram positivos (Objetivos de 40x)..

8.8 Análisis topográfico de los brackets.

8.8.1 Brackets sin sanitizar.

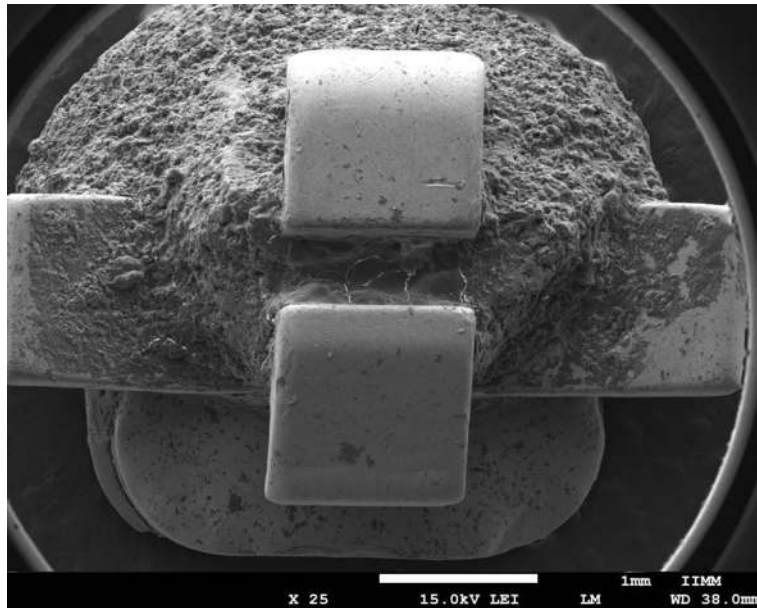


Fig. 29 Imagen de Bracket Alexander con acumulación de cálculo dental en la ranura, sobre las aletas y en la parte apical de la base.

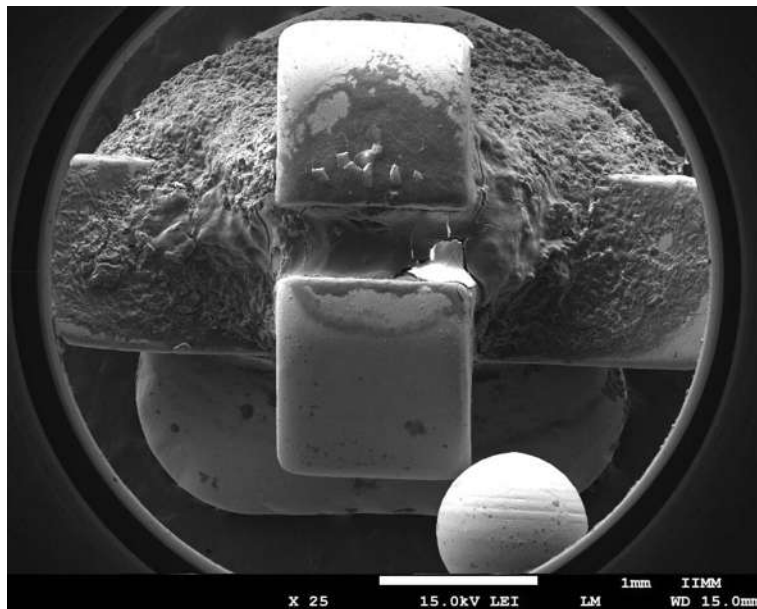


Fig. 30. Imagen de Bracket Alexander con acumulación de cálculo dental en la ranura, sobre las aletas y parte apical de la base.

VALORACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ÓXIDO DIALIL DISULFURO-MODIFICADO EN BIOFILM PROCEDENTE DE APARATOLOGÍA ORTODÓNICA

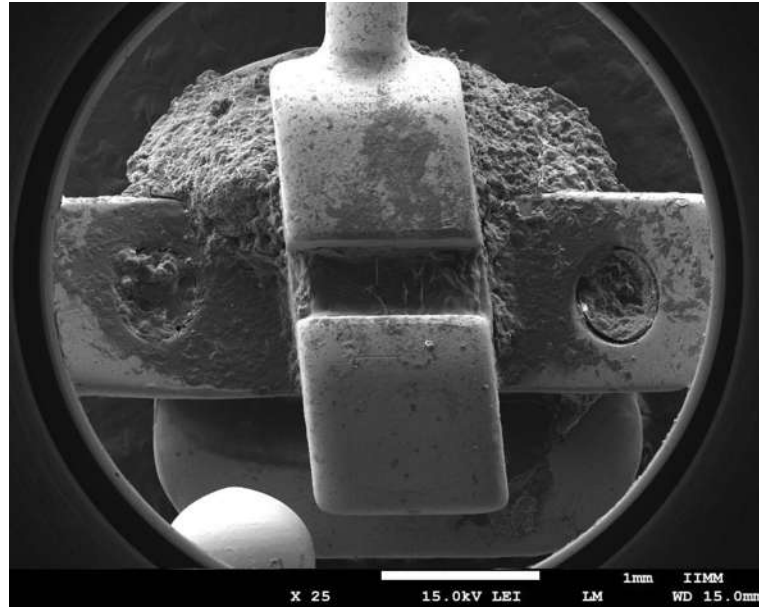


Fig. 31 Bracket Alexander en el que se observa la ranura y la parte inferior de la base cubierta de cálculo dental.

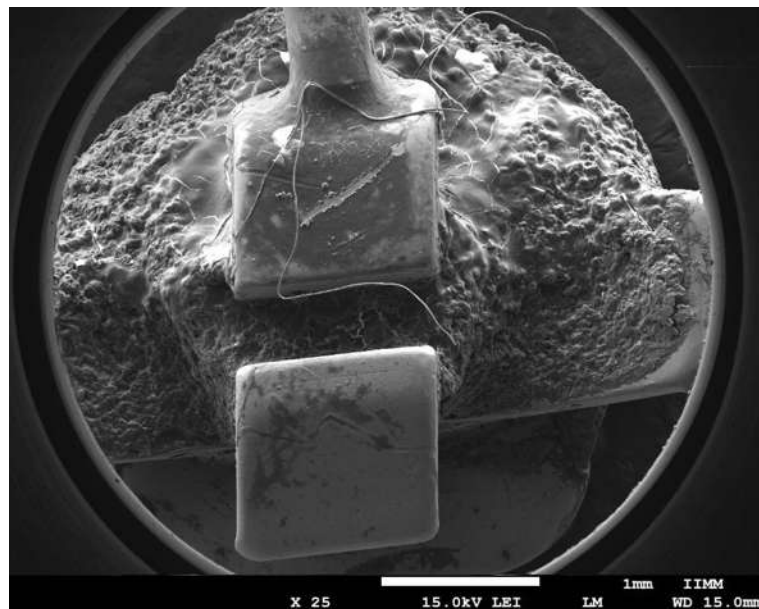


Fig. 32 Bracket Alexander en el que se observa la ranura, las aletas y la parte inferior de la base cubiertas por cálculo dental.

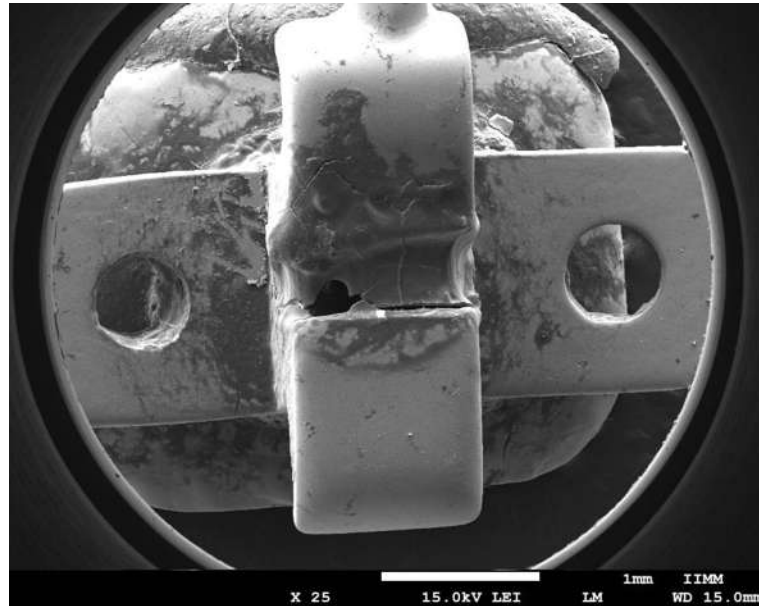


Fig. 33 Bracket Alexander con la ranura cubierta de cálculo dental.

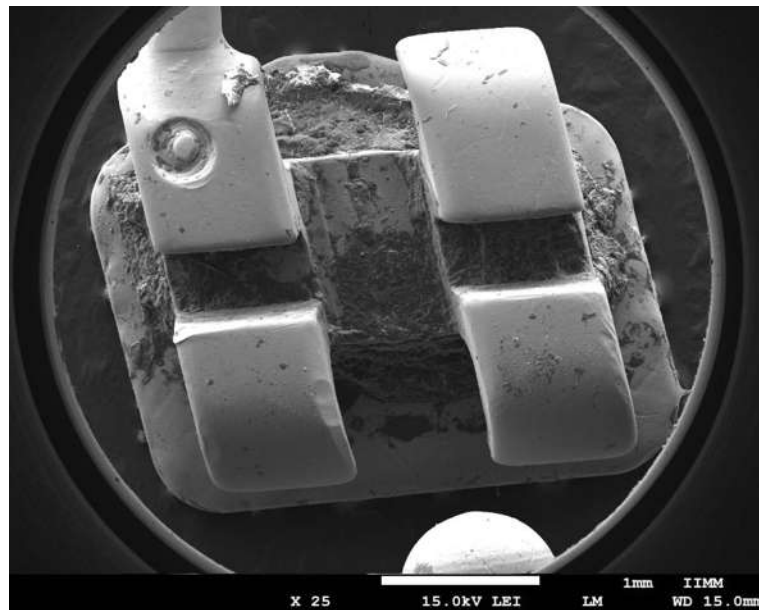


Fig. 34 Bracket gemelar Alexander con la base y la ranura ligeramente cubierta de cálculo dental.

8.8.2 Brackets sanitizados.

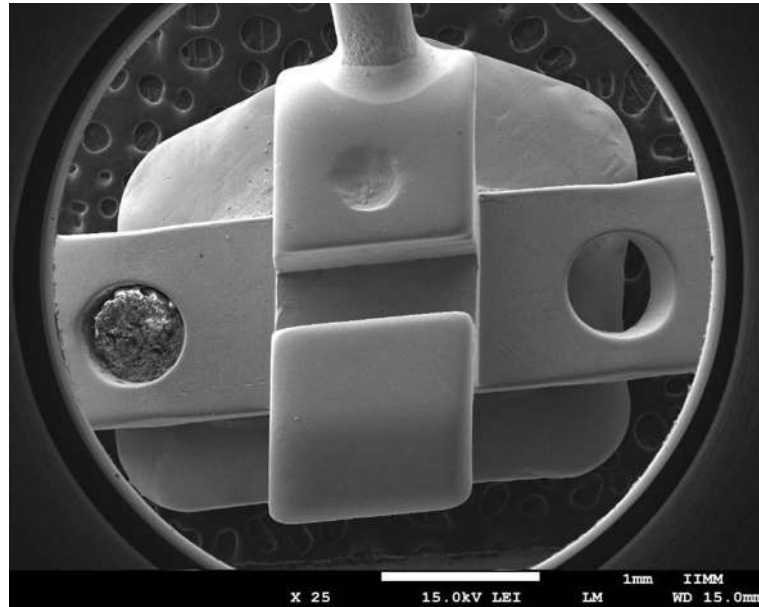


Fig. 35 Bracket Alexander en el que se observan daños en la ranura por fricción con el alambre, y sin daños por corrosión.

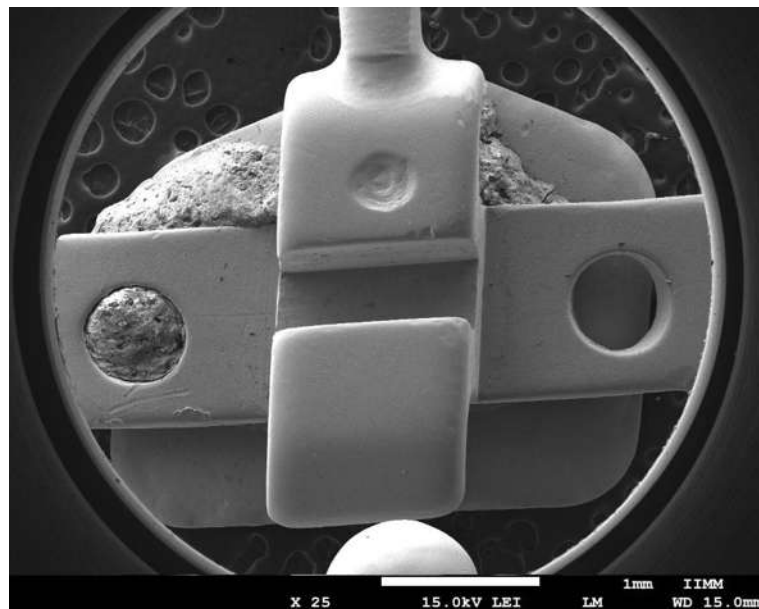


Fig. 36 Bracket Alexander el que se observan daños por fricción y fracturas en la ranura. Además, se observan machas en la superficie.

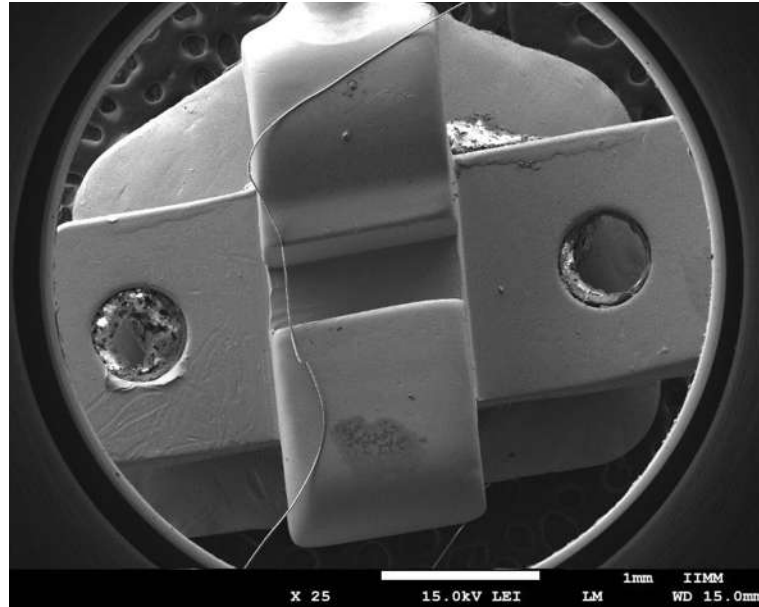


Fig. 37 Bracket Alexander con daños por fricción en la ranura.

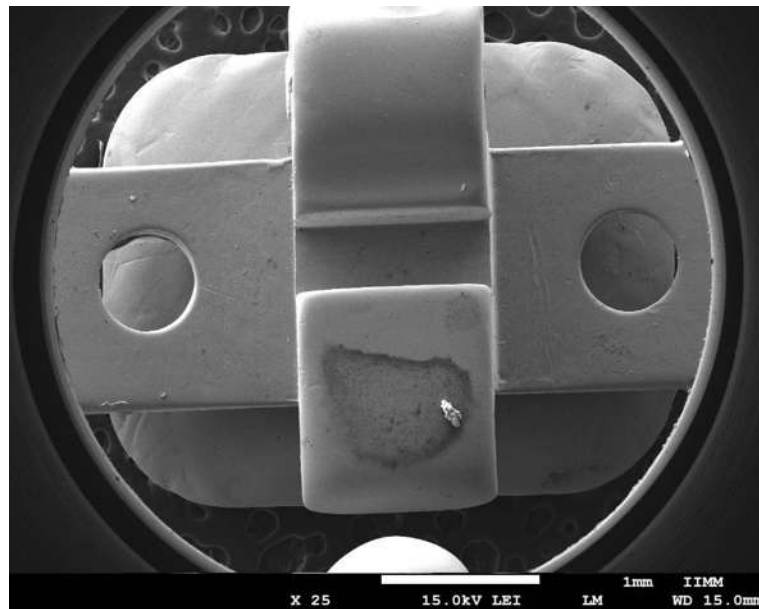


Fig. 38 Bracket Alexander en el cual se observan manchas oscuras en la ranura.

VALORACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ÓXIDO DIALIL DISULFURO-MODIFICADO EN BIOFILM PROCEDENTE DE APARATOLOGÍA ORTODÓNICA

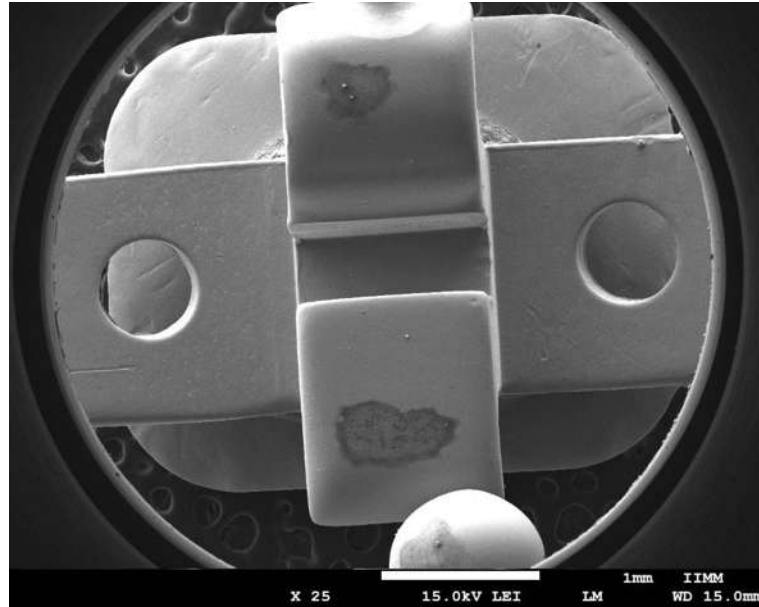


Fig. 39 Bracket Alexander el cual muestra daños en la ranura ocasionados por fricción con el alambre.

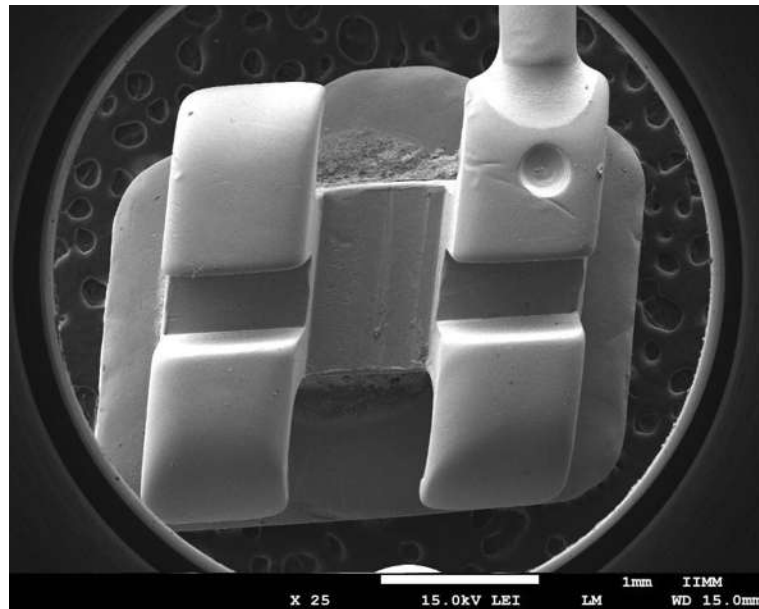


Fig. 40 Bracket gemelar con daños por fricción en la ranura y presencia de manchas oscuras.

9. Discusión.

El surgimiento de la resistencia bacteriana a antibióticos se ha convertido en uno de los retos más importantes en el tratamiento y prevención de infecciones, generando un considerable interés en el desarrollo de agentes terapéuticos altamente efectivos en el tratamiento de enfermedades infecciosas, y que presente mínimos efectos adversos⁷⁹. Agentes terapéuticos como el ODDM, cuya actividad antimicrobiana ha sido bien documentada, constituyen un método novedoso para terapias antimicrobianas sin generar resistencia o efectos adversos⁷. El desarrollo de complicaciones relacionadas al biofilm oral durante el tratamiento de ortodoncia es muy alto. Considerando la población actual de pacientes ortodóncicos en los Estados Unidos (5 millones), se estima que alrededor de 3 millones presentan efectos adversos relacionados al biofilm, y alrededor de 750,000 de estos pacientes requerirán atención profesional para corregir dichas complicaciones¹. Esto puede traducirse en serios impactos funcionales, estéticos y económicos en las vidas de los pacientes. La importancia de este estudio, radica en explorar la eficacia antimicrobiana del ODDM en biofilm proveniente de aparatología ortodóncica, permitiendo disminuir la incidencia de complicaciones relacionadas al biofilm durante el tratamiento ortodóncico.

La actividad antimicrobiana del ODD ha sido reportada ampliamente en la literatura, especialmente estudios recientes que han mostrado que tanto extractos de ajo como el ODD son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias orales^{10,80}. Los resultados del presente estudio igualmente demostraron que el ODD es capaz de reducir el crecimiento de bacterias orales provenientes de aparatología ortodóncica.

Para determinar la magnitud del efecto antimicrobiano del ODD (Accua Aséptic®), se comparó con la efectividad antimicrobiana de dos enjuagues a base de cloruro de cetilpiridinio (Colgate Plax® y Oral B®) y un colutorio a base de clorhexidina al 0.12% (Perioxidin®). Los resultados mostraron que los enjuagues bucales presentaron los mayores índices de unidades formadoras de colonias (UFC), Colgate Plax® reportó un crecimiento de $60E7 \pm 22.6E7$ UFC/ml y Oral B®: $36E7 \pm 23.2E7$ UFC/ml. Perioxidin® ($18E7 \pm 15.2E7$ UFC/ml) y Accua Aséptic® ($8E7 \pm 13.7E7$) presentaron un índice de contaminación menor a los enjuagues y al grupo control ($84E7 \pm 39.1E7$), $P < 0.05$. Accua Aséptic® mostró ser igualmente efectivo en la inhibición del crecimiento bacteriano en relación al colutorio de clorhexidina ($P > 0.05$). Si bien, de acuerdo a nuestro conocimiento no existe precedente en la comparación de ODD con soluciones de desinfección oral, los resultados observados en los experimentos entre los enjuagues y los colutorios, son coincidentes con estudios previos en la

literatura, los cuales colocan a la clorhexidina como el estándar dorado en el control de biofilm bacteriano oral^{81,82}.

Los resultados del presente estudio mostraron que una concentración de 80 µg/ml de ODD es capaz de mostrar un efecto antimicrobiano igual al de la clorhexidina. Si bien en la literatura no existe precedente en la comparación de ambas soluciones químicas, se han reportado concentraciones mínimas inhibitorias de 0.4-13.7 µg/ml en Gram negativos, y de 13.7-55 µg/ml en Gram positivos⁹. Por otra parte, los efectos citotóxicos del ODD han sido reportados en concentraciones de 150 a 500 µg/ml, y de 50 a 100 µg/ml no han mostrado efectos citotóxicos^{83,84}. En el caso específico de líneas de células orales se tiene poca información, y en la existente, en su mayoría no ha reportado procesos de apoptosis en concentraciones bajas. Sin embargo, Velliyagounder y colaboradores observaron muerte celular en cultivos de células epiteliales orales en concentraciones de 1 µg/ml¹⁰. Dada una falta de evidencia contundente sobre los efectos citotóxicos y antimicrobianos del óxido dialil disulfuro, son necesarios más estudios para entender las interacciones del ODD con células orales y bacterias.

De acuerdo a la patente, exposiciones de 30 segundos son suficientes para eliminar el 100% de las bacterias. Adicionalmente pruebas realizadas en la UNAM y la UAEM mostraron resultados similares, donde exposiciones de 30 y 60 segundos en microorganismos aislados de pacientes hospitalarios, mostraron al menos 99.17 % de disminución de la carga microbiana posterior al contacto con el ODDM¹¹. Para investigar si una exposición prolongada de tiempo podía afectar la efectividad del óxido dialil disulfuro, se establecieron diferentes tiempos de exposición dentro de lo que establecen las indicaciones para enjuagues y colutorios comerciales, así como la duración de cepillados. Los tiempos de exposición fueron de 1 minuto, 3 minutos y 5 minutos. A partir de esto pudimos observar patrones congruentes en relación a los tiempos de exposición, por ejemplo, en el caso de las muestras de Colgate Plax[®] expuestas a 1 y 3 minutos mostraron un índice crecimiento y media de población bacteriana mayor ($6.6E08 \pm 2.51E08$ U.F.C./ml), mientras que la muestra de 5 minutos mostro una media de población bacteriana menor ($4.8E08 \pm 1.64E08$ U.F.C./ml). Sin embargo, no existió una diferencia significativa entre los tiempos de exposición ($P > 0.05$). De igual manera en los grupos de Accua Aséptic[®], Oral B[®] y Periooxidin[®] no mostraron una diferencia significativa entre los tiempos de exposición, lo cual sugiere que una exposición mínima de 60 segundos es suficiente para disminuir el crecimiento bacteriano en biofilms orales.

El uso de tratamientos convencionales en el control de biofilm en pacientes ortodóncos ha mostrado por un lado efectos antimicrobianos insuficientes, y por otra parte efectos adversos que limitan su uso. En nuestra prueba el ODD mostro un significativo efecto antimicrobiano en biofilm

procedente de aparatología ortodoncia, con una concentración terapéutica que no ha reportado efectos tóxicos. Por lo cual, el uso de ODD parece ser seguro. Sin embargo, el uso de este en pruebas *in vivo* implica otros aspectos del compuesto que requieren ser evaluados. El potencial alérgeno del ajo es bien reconocido, y el ODD es considerado un potencial irritante. De hecho, se ha confirmado en estudios observacionales que las reacciones alérgicas ocurren en 1.1% de consumidores de ajo. Adicionalmente, múltiples reportes sugieren que la ingesta oral del ajo puede causar reacciones alérgicas, a pesar de que los casos reportados no permiten concluir definitivamente que existe una relación causal⁸⁵. Por lo tanto, evaluaciones de citotoxicidad sistémica y de sensibilidad al compuesto se requieren llevar a cabo antes de ser utilizado como un agente terapéutico en la clínica.

10. Conclusión.

- Mediante la evaluación del crecimiento bacteriano en los cultivos se observó que la exposición a diferentes intervalos de tiempo no mostró ser un factor determinante en la efectividad de ninguna de las soluciones químicas desinfectantes. Esto es especialmente importante en el caso del óxido dialil disulfuro, ya que una exposición de 1 a 5 minutos es suficiente para lograr un efecto antimicrobiano.
- El ODD es capaz de actuar eficazmente en una paridad posológica respecto a los colutorios y enjuagues orales.
- La comparación entre grupos mostró que el ODD no solo mostro un efecto antimicrobiano significativo en contra de biofilm proveniente de aparatología ortodónica, si no que mostró se más efectiva que los enjuagues a base de cloruro de cetilpiridinio (Colgate Plax® y Oral B®), y tener el mismo efecto antimicrobiano que el colutorio a base de clorhexidina (Perioxidin®). Estas propiedades hacen del ODD un candidato atractivo para uso terapéutico en el control de biofilm bacteriano en pacientes ortodónicos.
- La concentración terapéutica utilizada ha mostrado un efecto antimicrobiano significativo y sin efectos citotóxicos reportados en la literatura, es necesario realizar más estudios para determinar una concentración mínima inhibitoria, dado que existe reportes de reducción en el número de células orales en cultivos expuesto al oxido dialil disulfuro.
- Un porcentaje significativo de la población es alérgico al ajo, por lo tanto, es necesario realizar pruebas de hipersensibilidad al oxido dialil disulfuro, y así poder establecer un uso terapéutico seguro.

11. Referencias.

1. Ren Y, Jongsma MA, Mei L, van der Mei HC and Busscher HJ. Orthodontic treatment with fixed appliances and biofilm formation--a potential public health threat? *Clin Oral Investig*. 2014; 18: 1711-8.
2. Sallum EJ, Nouer DF, Klein MI, et al. Clinical and microbiologic changes after removal of orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2004; 126: 363-6.
3. Turkkahraman H, Sayin MO, Bozkurt FY, Yetkin Z, Kaya S and Onal S. Archwire ligation techniques, microbial colonization, and periodontal status in orthodontically treated patients. *Angle Orthod*. 2005; 75: 231-6.
4. Ristic M, Vlahovic Svabic M, Sasic M and Zelic O. Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances on periodontal tissues in adolescents. *Orthod Craniofac Res*. 2007; 10: 187-95.
5. Smith AW. Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005; 57: 1539-50.
6. Block E. The chemistry of garlic and onions. *Sci Am*. 1985; 252: 114-9.
7. Ankri S and Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect*. 1999; 1: 125-9.
8. Harris JC, Cottrell SL, Plummer S and Lloyd D. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001; 57: 282-6.
9. Bakri IM and Douglas CWI. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Arch Oral Biol*. 2005; 50: 645-51.
10. Velliyagounder K, Ganeshnarayan K, Velusamy SK and Fine DH. In vitro efficacy of diallyl sulfides against the periodontopathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56: 2397-407.
11. Armendáriz BJS, Magaña CJAR, Peña SP and Vázquez CL. Composición tópica semisólida conteniendo pirfenidona y dialil óxido de disulfuro modificado (odd-m) para eliminar o prevenir el acné. Google Patents, 2013.
12. Socransky SS and Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*. 2002; 28: 12-55.
13. Marsh PD. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent Clin North Am*. 2010; 54: 441-54.
14. Flemming HC and Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8: 623-33.
15. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS and Palmer RJ. Communication among Oral Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002; 66: 486-505.
16. Rogers JD, Palmer RJ, Jr., Kolenbrander PE and Scannapieco FA. Role of *Streptococcus gordonii* amylase-binding protein A in adhesion to hydroxyapatite, starch metabolism, and biofilm formation. *Infect Immun*. 2001; 69: 7046-56.
17. Nyvad B and Kilian M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res*. 1990; 24: 267-72.
18. Listgarten MA, Mayo H and Amsterdam M. Ultrastructure of the attachment device between coccid and filamentous microorganisms in "corn cob" formations of dental plaque. *Arch Oral Biol*. 1973; 18: 651-6.
19. Lamont RJ, El-Sabaeny A, Park Y, Cook GS, Costerton JW and Demuth DR. Role of the *Streptococcus gordonii* SspB protein in the development of *Porphyromonas gingivalis* biofilms on streptococcal substrates. *Microbiology*. 2002; 148: 1627-36.
20. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR and Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23: 196-205.

21. Selwitz RH, Ismail AI and Pitts NB. Dental caries. *Lancet*. 2007; 369: 51-9.
22. van Ruyven FO, Lingstrom P, van Houte J and Kent R. Relationship among mutans streptococci, "low-pH" bacteria, and iodophilic polysaccharide-producing bacteria in dental plaque and early enamel caries in humans. *J Dent Res*. 2000; 79: 778-84.
23. van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res*. 1994; 73: 672-81.
24. Zambon JJ and Kasprzak SA. The microbiology and histopathology of human root caries. *Am J Dent*. 1995; 8: 323-8.
25. Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 1986; 13: 905-11.
26. Highfield J. Diagnosis and classification of periodontal disease. *Aust Dent J*. 2009; 54 Suppl 1: S11-26.
27. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*. 2008; 79: 1569-76.
28. Holt SC and Ebersole JL. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2005; 38: 72-122.
29. Souto R, Silva-Boghossian CM and Colombo APV. Prevalence of Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter spp. in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Braz J Microbiol*. 2014; 45: 495-501.
30. Perez-Chaparro PJ, Goncalves C, Figueiredo LC, et al. Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. *J Dent Res*. 2014; 93: 846-58.
31. Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, et al. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog*. 2010; 6: e1000713.
32. Farah CS, Lynch N and McCullough MJ. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. *Aust Dent J*. 2010; 55 Suppl 1: 48-54.
33. Diaz PI, Strausbaugh LD and Dongari-Bagtzoglou A. Fungal-bacterial interactions and their relevance to oral health: linking the clinic and the bench. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014; 4.
34. Evans DJ, Allison DG, Brown MR and Gilbert P. Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli biofilms towards ciprofloxacin: effect of specific growth rate. *J Antimicrob Chemother*. 1991; 27: 177-84.
35. Duguid IG, Evans E, Brown MR and Gilbert P. Growth-rate-independent killing by ciprofloxacin of biofilm-derived Staphylococcus epidermidis; evidence for cell-cycle dependency. *J Antimicrob Chemother*. 1992; 30: 791-802.
36. Duguid IG, Evans E, Brown MR and Gilbert P. Effect of biofilm culture upon the susceptibility of Staphylococcus epidermidis to tobramycin. *J Antimicrob Chemother*. 1992; 30: 803-10.
37. Wentland EJ, Stewart PS, Huang CT and McFeters GA. Spatial variations in growth rate within Klebsiella pneumoniae colonies and biofilm. *Biotechnol Prog*. 1996; 12: 316-21.
38. Stewart PS, Griebe T, Srinivasan R, et al. Comparison of respiratory activity and culturability during monochloramine disinfection of binary population biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 1994; 60: 1690-2.
39. Korber DR, James GA and Costerton JW. Evaluation of Fleroxacin Activity against Established Pseudomonas fluorescens Biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 1994; 60: 1663-9.
40. Bjarnsholt T and Givskov M. The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor Pseudomonas aeruginosa. *Anal Bioanal Chem*. 2007; 387: 409-14.
41. Jensen PO, Bjarnsholt T, Phipps R, et al. Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology*. 2007; 153: 1329-38.

42. Bjarnsholt T, Jensen PO, Burmolle M, et al. Pseudomonas aeruginosa tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology*. 2005; 151: 373-83.
43. Driffield K, Miller K, Bostock JM, O'Neill AJ and Chopra I. Increased mutability of Pseudomonas aeruginosa in biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 61: 1053-6.
44. Ciofu O, Giwercman B, Pedersen SS and Hoiby N. Development of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa during two decades of antipseudomonal treatment at the Danish CF Center. *APMIS*. 1994; 102: 674-80.
45. Ciofu O. Pseudomonas aeruginosa chromosomal beta-lactamase in patients with cystic fibrosis and chronic lung infection. Mechanism of antibiotic resistance and target of the humoral immune response. *APMIS Suppl*. 2003: 1-47.
46. Jalal S, Ciofu O, Hoiby N, Gotoh N and Wretling B. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44: 710-2.
47. Al Mulla AH, Kharsa SA, Kjellberg H and Birkhed D. Caries risk profiles in orthodontic patients at follow-up using Cariogram. *Angle Orthod*. 2009; 79: 323-30.
48. Liu Y, Zhang Y, Wang L, Guo Y and Xiao S. Prevalence of Porphyromonas gingivalis Four Locus Genotypes in Patients of Orthodontic Gingivitis and Periodontitis. *PLoS One*. 2013; 8: e61028.
49. Demling A, Heuer W, Elter C, et al. Analysis of supra- and subgingival long-term biofilm formation on orthodontic bands. *Eur J Orthod*. 2009; 31: 202-6.
50. Sukontapatipark W, el-Agroudi MA, Selliseth NJ, Thunold K and Selvig KA. Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances. A scanning electron microscopy study. *Eur J Orthod*. 2001; 23: 475-84.
51. Mei L, Busscher HJ, van der Mei HC, Chen Y, de Vries J and Ren Y. Oral bacterial adhesion forces to biomaterial surfaces constituting the bracket-adhesive-enamel junction in orthodontic treatment. *Eur J Oral Sci*. 2009; 117: 419-26.
52. Murphy TC, Willmot DR and Rodd HD. Management of postorthodontic demineralized white lesions with microabrasion: a quantitative assessment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2007; 131: 27-33.
53. Øgaard B. White Spot Lesions During Orthodontic Treatment: Mechanisms and Fluoride Preventive Aspects. *Semin Orthod*. 14: 183-93.
54. Miyawaki S, Koyama I, Inoue M, Mishima K, Sugahara T and Takano-Yamamoto T. Factors associated with the stability of titanium screws placed in the posterior region for orthodontic anchorage. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2003; 124: 373-8.
55. Kravitz ND and Kusnoto B. Risks and complications of orthodontic miniscrews. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2007; 131: S43-51.
56. Erverdi N, Biren S, Kadir T and Acar A. Investigation of bacteremia following orthodontic debanding. *Angle Orthod*. 2000; 70: 11-4; discussion 5.
57. Gurel HG, Basciftci FA and Arslan U. Transient bacteremia after removal of a bonded maxillary expansion appliance. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2009; 135: 190-3.
58. Eliades T and Bourauel C. Intraoral aging of orthodontic materials: the picture we miss and its clinical relevance. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2005; 127: 403-12.
59. Beyth N, Bahir R, Matalon S, Domb AJ and Weiss EI. Streptococcus mutans biofilm changes surface-topography of resin composites. *Dent Mater*. 2008; 24: 732-6.

60. Schmidt JC, Zaugg C, Weiger R and Walter C. Brushing without brushing?--a review of the efficacy of powered toothbrushes in noncontact biofilm removal. *Clin Oral Investig*. 2013; 17: 687-709.
61. Sari E and Birinci I. Microbiological evaluation of 0.2% chlorhexidine gluconate mouth rinse in orthodontic patients. *Angle Orthod*. 2007; 77: 881-4.
62. Busscher HJ, Rinastiti M, Siswomihardjo W and van der Mei HC. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *J Dent Res*. 2010; 89: 657-65.
63. Otten MP, Busscher HJ, van der Mei HC, Abbas F and van Hoogmoed CG. Retention of antimicrobial activity in plaque and saliva following mouthrinse use in vivo. *Caries Res*. 2010; 44: 459-64.
64. Cavallito C and Bailey JH. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. Isolation, physical properties and antibacterial action. *J Am Chem Soc* 1944; 66
65. Rabinkov A, Miron T, Konstantinovski L, Wilchek M, Mirelman D and Weiner L. The mode of action of allicin: trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1379: 233-44.
66. Ankri S, Miron T, Rabinkov A, Wilchek M and Mirelman D. Allicin from garlic strongly inhibits cysteine proteinases and cytopathic effects of *Entamoeba histolytica*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41: 2286-8.
67. Feldberg RS, Chang SC, Kotik AN, et al. In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988; 32: 1763-8.
68. Kockar C, Ozturk M and Bavbek N. Helicobacter pylori eradication with beta carotene, ascorbic acid and allicin. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2001; 44: 97-100.
69. Yoshida H, Katsuzaki H, Ohta R, et al. Antimicrobial activity of the thiosulfinates isolated from oil-macerated garlic extract. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1999; 63: 591-4.
70. Cutler RR and Wilson P. Antibacterial activity of a new, stable, aqueous extract of allicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Br J Biomed Sci*. 2004; 61: 71-4.
71. Cai Y, Wang R, Pei F and Liang B-B. Antibacterial Activity of Allicin Alone and in Combination with [beta]-Lactams against *Staphylococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antibiot*. 2007; 60: 335-8.
72. Cai Y, Wang R, An M-M, Liang B-B and Fang Y. In vitro bactericidal activity of allicin combined with cefoperazone, tobramycin and ciprofloxacin. *Int J Antimicrob Agents*. 31: 179-80.
73. An M, Shen H, Cao Y, et al. Allicin enhances the oxidative damage effect of amphotericin B against *Candida albicans*. *Int J Antimicrob Agents*. 33: 258-63.
74. Bachrach G, Jamil A, Naor R, Tal G, Ludmer Z and Steinberg D. Garlic allicin as a potential agent for controlling oral pathogens. *J Med Food*. 2011; 14: 1338-43.
75. Hobauer R, Frass M, Gmeiner B, Kaye AD and Frost EA. Garlic extract (*Allium sativum*) reduces migration of neutrophils through endothelial cell monolayers. *Middle East J Anaesthesiol*. 2000; 15: 649-58.
76. Sela U, Ganor S, Hecht I, et al. Allicin inhibits SDF-1 α -induced T cell interactions with fibronectin and endothelial cells by down-regulating cytoskeleton rearrangement, Pyk-2 phosphorylation and VLA-4 expression. *Immunology*. 2004; 111: 391-9.
77. Lang A, Lahav M, Sakhnini E, et al. Allicin inhibits spontaneous and TNF- α induced secretion of proinflammatory cytokines and chemokines from intestinal epithelial cells. *Clin Nutr*. 2004; 23: 1199-208.
78. Haase H, Hieke N, Plum LM, Gruhlke MCH, Slusarenko AJ and Rink L. Impact of allicin on macrophage activity. *Food Chem*. 2012; 134: 141-8.

79. Nathan C and Cars O. Antibiotic resistance--problems, progress, and prospects. *N Engl J Med*. 2014; 371: 1761-3.
80. Bakri IM and Douglas CW. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Arch Oral Biol*. 2005; 50: 645-51.
81. Pitten FA and Kramer A. Efficacy of cetylpyridinium chloride used as oropharyngeal antiseptic. *Arzneimittelforschung*. 2001; 51: 588-95.
82. Varoni E, Tarce M, Lodi G and Carrassi A. Chlorhexidine (CHX) in dentistry: state of the art. *Minerva Stomatol*. 2012; 61: 399-419.
83. Alpers DH. Garlic and its potential for prevention of colorectal cancer and other conditions. *Curr Opin Gastroenterol*. 2009; 25: 116-21.
84. Belloir C, Singh V, Daurat C, Siess MH and Le Bon AM. Protective effects of garlic sulfur compounds against DNA damage induced by direct- and indirect-acting genotoxic agents in HepG2 cells. *Food Chem Toxicol*. 2006; 44: 827-34.
85. Borrelli F, Capasso R and Izzo AA. Garlic (*Allium sativum* L.): adverse effects and drug interactions in humans. *Mol Nutr Food Res*. 2007; 51: 1386-97.