

Efecto en la ingesta de chicles con distintas concentraciones de xilitol sobre el flujo, Ph y concentración de *Streptococcus mutans* salivares en niños de edades comprendidas entre 6 y 12 años.

Marta Ribelles Llop

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Efecto en la ingesta de chicles con distintas concentraciones de xilitol sobre el flujo, Ph y concentración de Streptococcus mutans salivares en niños de edades comprendidas entre 6 y 12 años

Autora: Marta Ribelles Llop

Tutores: Dr Luís Giner - Dr Luís Bellet - Dr Josep Clotet

Departamento de Odontopediatría

Universitat Internacional de Catalunya

Sant Cugat del Vallés, 8 de Septiembre del 2008

A mis padres, a Elena, a mis abuelitas Maria y Pilar, y a tres ángeles que me cuidan día a día desde un lugar llamado cielo.

Después de agradecer a mi familia que sin lugar a duda constituyen mi máximo apoyo durante el día a día y que han sido fundamentales en mi formación académica quiero agradecer a cada una de las personas que han contribuido especialmente en la elaboración de este trabajo. Dentro de este apartado "*familia*" quiero agradecer la gran ayuda de Blanca, que durante todos los días de registro estuvo a mi lado, ayudándome y haciéndome más fácil la recogida de datos, de forma incondicional...

Agradecer el apoyo recibido de parte de la Directora del CP Nuestra Señora de la Consolación de Vila-Real, Ana Mezquita Broch, pues sin su ayuda nada de este proyecto hubiese sido posible. Muchas gracias Ana por todo; pues sé que hiciste parte de ti la investigación, facilitándome el trabajo durante mis presencias y ausencias para que el estudio funcionase excelentemente. Agradecer aquí también el trabajo de las profesoras: Pili Porcar, Inma Sancho, Araceli Ruiz, Carmen Herrero, Alexandra Barrue, Rosita Cerisuelo, Esther Basiero, Inma Gil y Amparo Grao, pues aunque, el repartir los chicles interfiriese en sus clases, sé que guardarán un bonito recuerdo.

Seguidamente quiero agradecer a una persona maravillosa, que se ha convertido en un ángel para mí durante toda la redacción de esta investigación, Ana Asensio. Ana empezaste ayudándome con la estadística y poco a poco te convertiste en la segunda pieza clave de esta obra, física y espiritualmente. Tras muchos ratos de nervios y tardes sin playa hemos conseguido llegar al final del túnel.... SIN TI NADA HABRIA SIDO POSIBLE...

También agradecer a mis directores de tesis, los Dres Luís Giner, Luís Bellet y Josep Clotet. Gracias Dr Giner por enseñarme algo más que el acto médico, enseñarme humanidad y salir adelante a pesar de las dificultades, dificultades que se superan con el trabajo y la constancia. Gracias Dr Bellet por ser mi maestro de odontopediatria, disciplina que me permite disfrutar el día a día. Gracias Dr Clotet por enseñarme el maravilloso mundo de la microbiología, y enseñarme una realidad distinta al acto médico-paciente.

Quiero agradecer a las casa comerciales Cupa-chups® y Miradent® por su generosidad en el momento de ofrecernos los chicles para realizar el estudio. Destacar las facilidades que nos ofreció Cati Perez, vínculo de unión de Chupa-chups® con nuestra universidad al enviarnos los chicles y obsequios para regalar a los niños participantes. Agradecer a Jens Sten, de Miradent®, por las facilidades en enviarnos los chicles desde Alemania, a pesar de la excasez del tiempo...

Agradecer a todos mis compañeros de profesión y amistades por compartir conmigo el día a día... A aquellos que están cerca y a aquellos que están lejos...

Por último lugar, y no por ser menos importantes, agradecer a cada uno de los niños y sus padres el haber participado en este estudio...Tienen el papel más importante ... Os reservo para el final porque sin duda nada podría haber sido posible sin vuestra ayuda.. Sin duda SOIS LOS VERDADEROS PROTAGONISTAS.....

Muchas gracias a todos.....

INDICE GENERAL

1. JUSTIFICACIÓN	1
2. OBJETIVOS	5
3. FUNDAMENTOS	8
3.1 INTRODUCCIÓN	9
3.2 CARIES DENTAL	12
3.3 SALIVA Y SALUD BUCAL	37
3.4 XILITOL Y OTROS EDULCORANTES	44
3.5 EL CHICLE COMO MÉTODO ANTICARIOGÉNICO	49
3.6 ACTUALIZACIÓN DE CONCEPTOS	68
4. HIPÓTESIS DE TRABAJO	69
5. SUJETOS, MATERIALES, MÉTODOS	72
6. RESULTADOS	
6.1 VARIABLE DEPENDIENTE FLUJO (ANOVA FACTORIAL)	92
6.2 VARIABLE DEPENDIENTE PH (ANOVA FACTORIAL)	96
6.3 VARIABLE DEPENDIENTE SM (ANOVA FACTORIAL)	100
6.4 COMPARACIÓN DE MEDIAS	104
6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO TÉCNICA SPLIT- PLOT	109
6.6 VARIABLE DEPENDIENTE FLUJO	110
6.7 VARIABLE DEPENDIENTE PH	118
6.8 VARIABLE DEPENDIENTE SM	126
7. DISCUSIÓN	153
8. CONCLUSIONES	174
9. PERSPECTIVAS DE FUTURO	176
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	179
11. ANEXOS	204

INDICE DE CONTENIDOS

1. Imagen 3.1	Policaries en odontopediatria	15
2. Imagen 3.2	Apiñamiento dental que favorece el desarrollo de caries	19
3. Imagen 5.1	Niños de distintas edades participantes en el estudio	73
4. Imagen 5.2	Materiales necesarios para la determinación de las variables	76
5. Imagen 5.3	Consentimientos firmados padres	77
6. Imagen 5.4	Variantes de chicles empleados en el estudio	79
7. Imagen 5.5	Distribución chicles en bolsas (I)	81
8. Imagen 5.6	Distribución chicles en bolsas (II)	81
9. Imagen 5.7	Recogida de muestra saliva	85
10. Imagen 5.8	Determinación flujo y Ph salivar	86
11. Imagen 5.9	Cultivo e incubación SM	87
12. Imagen 5.10	Valores UFC SM	88
13. Imagen 5.11	Recuento bacterias	89
14. Imagen 5.12	Contenedores de residuos biológicos	90

INDICE DE TABLAS

1. Tabla 3.1 Etiología de la caries	17
2. Tabla 3.2 Factores que influyen en la secreción salivar	40
3. Tabla 5.1 Distribución participantes según grupo	80
4. Tabla 5.2 Composición química DIFCO™ Mitis salivarius agar	83
5. Tabla 6.1 Análisis de la varianza para flujo	92
6. Tabla 6.2 Gráfico de medias de la variable flujo para el factor tiempo	93
7. Tabla 6.3 Gráfico de medias de la variable flujo para el factor tratamiento	93
8. Tabla 6.4 Tabla interacción variable flujo para ambos factores	94
9. Tabla 6.5 Gráfico interacción variable flujo para ambos factores	95
10. Tabla 6.6 Análisis de la varianza para Ph	96
11. Tabla 6.7 Gráfico de medias de la variable Ph para el factor tiempo	97
12. Tabla 6.8 Gráfico de medias de la variable Ph para el factor tratamiento	97
13. Tabla 6.9 Tabla interacción variable Ph para ambos factores	98
14. Tabla 6.10 Gráfico interacción variable Ph para ambos factores	99
15. Tabla 6.11 Análisis de la varianza para SM	100
16. Tabla 6.12 Gráfico de medias de la variable SM para el factor tiempo	101

17.	Tabla 6.13 Gráfico de medias de la variable SM para el factor tratamiento	101
18.	Tabla 6.14 Tabla interacción variable SM para ambos factores	102
19	Tabla 6.15 Gráfico interacción variable flujo para ambos factores	103

JUSTIFICACIÓN

La disminución de la caries dental no se ha producido de manera casual, sino que se debe a la aplicación satisfactoria de medidas preventivas adecuadas. Las estrategias preventivas se orientan hacia la intercepción de cada uno de los factores implicados en la etiología de la caries. Por tanto, la actuación del odontólogo se basa en: aconsejar modificaciones en la dieta; aplicar estrategias orientadas a aumentar la resistencia del diente, como la administración de flúor y la aplicación de selladores de fosas y fisuras; y, por último el control de la placa dental, bien sea mecánica, mediante la enseñanza de técnicas de cepillado óptimas, química, con la utilización de la clorhexidina, o mixta, mediante la masticación de chicles edulcorados con xilitol.

Los estudios epidemiológicos actuales indican un sesgo en cuanto a la distribución de la caries en la población, concentrándose una alta incidencia de caries en determinados individuos y comunidades. Por este motivo, el odontólogo debe aplicar una estrategia preventiva individualizada, adaptada a las características del riesgo de caries de cada niño. La *Organización Mundial de la Salud* (OMS) recomienda la realización de encuestas de salud oral periódicas cada cinco años con objeto de monitorizar la evolución del nivel de salud oral de las poblaciones y analizar los cambios ocurridos. El *Consejo General de Dentistas* ha organizado y financiado las últimas cuatro encuestas de este tipo a nivel nacional, en 1993, 2000, 2005 y 2007. Dichas encuestas contemplan las cohortes etarias de 5-6, 12-15, 35-44 y 65-74 años. Los importantes cambios de política sanitaria en salud dental, principalmente orientados a la población infantil, obligan a profundizar en el conocimiento del estado de salud de estas edades. En la encuesta realizada en el 2005, que estudia todos los grupos etarios, se pueden apreciar niveles más bajos en los índices de caries, a nivel general.

Por todos es conocido el descenso, durante los últimos años, de la prevalencia de la caries en los países desarrollados, sobre todo entre escolares de los EEUU y de los Países Escandinavos. El descenso de la prevalencia de la caries en los países de la Unión Europea, se debe a un plan de motivación por parte de odontólogos, padres y educadores, que tiene como fin principal la adquisición de hábitos de dieta e higiene correctos por parte del niño. En España, aunque en menor escala, y tras analizar los datos recogidos en las últimas encuestas realizadas por el Consejo General, también se ha producido un descenso de los niveles de caries.

Los primeros estudios relacionados con la utilización del chicle en odontología datan de los años 70. *Turku Sugar Studies*, entre 1970 y 1973 demuestran las excelentes propiedades anti-caries del chicle edulcorado con xilitol. En la actualidad, son muchos los profesionales, especialmente en los Países Escandinavos, que han estudiado el papel del chicle como una estrategia preventiva más frente al control del desarrollo de la caries dental. Analizando la bibliografía hemos podido averiguar cómo son numerosas las investigaciones que estudian la masticación de chicles edulcorados con xilitol incorporados en campañas de prevención de la caries en determinadas poblaciones escolares. Este hecho, constituye la *motivación principal* para realizar este estudio, con el interés de demostrar la posibilidad de incluir la masticación de chicles edulcorados con xilitol, como una estrategia más de prevención frente al desarrollo de la caries dental en nuestros centros de enseñanza, ya que el papel preventivo del chicle es poco conocido por la población española.

El *planteamiento del problema* surgió tras la realización de un estudio preliminar de tipo transversal *in vivo* que tenía como objetivo principal evaluar el flujo salivar, pH, capacidad tampón y concentración de *Streptococcus mutans* en niños de un colegio tras la ingesta de hidratos de carbono y masticación de un chicle edulcorado con xilitol, porción de parafina o no masticación. Se observó que no existían diferencias estadísticamente significativas entre la masticación de chicles edulcorados con xilitol y porciones de parafina vs la no masticación, demostrándose así que el efecto de la masticación, más que el tipo de edulcorante, resulta fundamental en la prevención de la caries dental. Sin embargo, la bibliografía demuestra que tratamientos mediante la masticación con chicles de distintas concentraciones de xilitol producen modificaciones en la disminución de *Streptococcus mutans*. De este modo nos interesamos en demostrar cómo estos parámetros, y especialmente la concentración de esta especie bacteriana, podían modificarse longitudinalmente, durante 28 días, tras la masticación de tres porciones diarias de chicles edulcorados con xilitol a distintas concentraciones.

En cuanto a la *estructura del trabajo*, en primer lugar, estableceremos nuestros objetivos de estudio, elaboraremos un resumen de las bases bibliográficas actuales relacionadas con nuestra investigación y reseñaremos con claridad las hipótesis de trabajo. Será importante la descripción de la metodología empleada, especificando los materiales y métodos utilizados. A continuación se mostraran los resultados del estudio, tras el análisis estadístico-informático, para su posterior discusión, realizando comparaciones con otros estudios realizados anteriormente y establecer nuestras conclusiones.

*O*BJETIVOS

Una vez establecida la justificación que ha motivado a realizar este estudio, consideramos como *objetivo principal* comparar el flujo, pH y la concentración de *Streptococcus mutans* salivares de niños de 6 a 12 años de edad que mastican chicles edulcorados con xilitol a distintas concentraciones y sin xilitol.

Debemos tener presente la consideración de una serie de *objetivos específicos*, que influyen de manera directa, en la determinación del objetivo principal:

1. Evaluar el flujo, pH y concentración de *Streptococcus mutans* salivares en condiciones basales de niños de 6 a 12 años que masticarán chicles que no contienen xilitol como edulcorante.
2. Evaluar el flujo, pH y concentración de *Streptococcus mutans* salivares en condiciones basales de niños de 6 a 12 años que masticarán chicles que contienen un 5% de xilitol como edulcorante.
3. Evaluar el flujo, pH y concentración de *Streptococcus mutans* salivares en condiciones basales de niños de 6 a 12 años que masticarán chicles que contienen un 30% de xilitol como edulcorante.
4. Evaluar el flujo, pH y concentración de *Streptococcus mutans* salivares en condiciones basales de niños de 6 a 12 años que masticarán chicles que contienen un 67 % de xilitol como edulcorante.
5. Evaluar y comparar el flujo, pH y concentración de *Streptococcus mutans* salivares a los 15 días del inicio del tratamiento, de niños de 6 a 12 años que masticarán chicles que no contienen xilitol como edulcorante.
6. Evaluar y comparar el flujo, pH y concentración de *Streptococcus mutans* salivares a los 15 días del inicio del tratamiento, de niños de 6 a 12 años que masticarán chicles que contienen un 5% de xilitol como edulcorante.

7. Evaluar y comparar el flujo, pH y concentración de *Streptococcus mutans* salivares a los 15 días del inicio del tratamiento, de niños de 6 a 12 años que masticarán chicles que contienen un 30% de xilitol como edulcorante.
8. Evaluar y comparar el flujo, pH y concentración de *Streptococcus mutans* salivares a los 15 días del inicio del tratamiento, de niños de 6 a 12 años que masticarán chicles que contienen un 67% de xilitol como edulcorante.
9. Evaluar el flujo, pH y concentración de *Streptococcus mutans* salivares a los 30 días del inicio del tratamiento, de niños de 6 a 12 años que masticarán chicles que no contienen xilitol como edulcorante.
10. Evaluar y comparar el flujo, pH y concentración de *Streptococcus mutans* salivares a los 30 días del inicio del tratamiento, de niños de 6 a 12 años que masticarán chicles que contienen un 5% de xilitol como edulcorante.
11. Evaluar y comparar el flujo, pH y concentración de *Streptococcus mutans* salivares a los 30 días del inicio del tratamiento, de niños de 6 a 12 años que masticarán chicles que contienen un 30% de xilitol como edulcorante.
12. Evaluar y comparar el flujo, pH y concentración de *Streptococcus mutans* salivares a los 30 días del inicio del tratamiento, de niños de 6 a 12 años que masticarán chicles que contienen un 67% de xilitol como edulcorante.

FUNDAMENTOS

3.1 INTRODUCCIÓN.

La caries dental constituye la tercera enfermedad en importancia en nuestro país después del cáncer y de las enfermedades cardio-vasculares. Es una enfermedad endémica en nuestro medio, hasta el punto de ser aceptada por la mayor parte de la población como algo consustancial con su existencia ¹.

Las encuestas nacionales sobre salud bucodental tienen como función básica el proporcionar una idea de conjunto sobre salud y necesidades de tratamiento poblacional con el fin de vigilar la evolución de las tasas de morbilidad. Nos permiten conocer: la medida en que los servicios odontológicos existentes responden a las necesidades de la población; la naturaleza y cuantía de los servicios de prevención y restauración requeridos y los recursos necesarios para implantar, mantener, aumentar o reducir los programas de salud bucodental, estimando las necesidades cuantitativas y el tipo de personal requerido². La *Organización Mundial de la Salud* (OMS) recomienda la realización de encuestas de salud oral periódicas cada cinco años con objeto de monitorizar la evolución del nivel de salud oral de las poblaciones y analizar los cambios ocurridos ³

Entre el 1968-1969 se realiza en España la primera encuesta a nivel nacional para conocer los índices de caries. En ella se exploran 649.601 escolares, encontrando un porcentaje de prevalencia de caries del 73'40% ⁴. En 1993 el *Ilustre Consejo General de Colegios de Dentistas de España* encargó la realización de una encuesta epidemiológica bucodental, siguiendo los criterios establecidos por la OMS para la ejecución de estudios transversales tipo pathfinder. En el año 2000, el Consejo General encargó otro nuevo estudio epidemiológico. Las principales conclusiones de la Encuesta del 2000 fueron la detección de una clara mejoría de la salud dental en las cohortes más jóvenes, fundamentalmente una clara reducción de la caries en el grupo de 12 años así como una clara percepción de un aumento de la atención dental dispensada. Transcurridos cinco años, la necesidad de monitorizar la situación oral de nuestra población justificó la necesidad de realizar el siguiente proyecto. Este hecho queda demostrado en la última encuesta llevada a cabo por el *Ilustre Consejo General de Dentistas de España*, realizada en el 2005, donde se pueden apreciar niveles más bajos en los índices de caries. Se observa en una muestra de 470 niños de edades comprendidas entre 5 y 6 años, que presentan un índice de caries en dentición temporal de 36,3 y en dentición permanente de 3,5 ; de igual manera a la edad de 12 años, 501 niños presentan un índice de caries de 47,2 ². En el 2007 se realizó la última encuesta de salud en España, que pretendía conocer el estado de salud oral de preescolares (3 y 4 años) de una muestra representativa de la población española, con el objetivo de completar la información ya recogida en la encuesta nacional del 2005, cuyo primer grupo etario era el de los 5-6 años de edad. Se trata del primer estudio epidemiológico sobre salud bucal que se realiza en estas edades en España, que permite un mejor conocimiento del estado de la dentición temporal en nuestra población infantil. En esta encuesta, la prevalencia de caries fue del 17.4% en una muestra de 522 niños de 3 años de edad, aumentando al 26,2% en un grupo de 588 niños de 4 años de edad ³.

En los últimos 15 años en nuestro país se han desarrollado proyectos de prevención en caries dental, que han llegado a la población, en mayor ó menor medida, dependiendo de la administración pública que los desarrollara, y que han posibilitado la obtención de una inversión en las tendencias de caries, tanto en la prevalencia como en su intensidad ¹. Los objetivos de la OMS en su programa de salud para todos en el año 2000, tenían como misión establecer una prevalencia del 50% a los 6 años y un índice CAO-D menor de tres a los 12 años ⁵. La caries en dentición temporal, a diferencia de lo ocurrido en dentición permanente, no ha disminuido, en España ³.

La caries en dentición temporal constituye un problema de salud pública incluso en países desarrollados como China. El Servicio de Salud Nacional Epidemiológico de esta República publicó niveles altos de prevalencia de caries del 76.55% a los 5 años de edad; en términos de gravedad de tratamiento, un 55% de los niños necesitaban un tratamiento, el 47% dos tratamientos, el 15.4% requerían siete dientes a tratar y un 4.5% tenía 9 dientes afectados por caries ⁶.

Varios estudios demuestran la disminución de la prevalencia de caries producida en los últimos años debido a la introducción de las pastas dentífricas fluoradas, a la implantación de programas de salud bucodental, aplicación de selladores de fosas y fisuras y al aumento del nivel socioeconómico de la población ⁷⁻¹³. Es imprescindible por tanto, la estandarización de medidas preventivas frente a la caries dental, cuya actuación se circunscribe en tres niveles: a nivel del diente (flúor tópico y sistémico, selladores de fosas y fisuras, y amelooplastias); a nivel de la dieta (disminución del consumo de sacarosa, sustitución por edulcorantes calóricos o no calóricos) y a nivel de los microorganismos (control de la placa) ^{13,14}. De entre todas las estrategias preventivas anteriores, en la actualidad, existen distintas investigaciones que hablan del efecto preventivo y remineralizador del chicle en la prevención de la caries dental ¹⁵⁻¹⁸.

3.2 LA CARIES DENTAL

3.2.1 Antecedentes históricos.

Desde los tiempos más remotos, el hombre ha tenido una incesante preocupación por las enfermedades del aparato dentario y su reparación, para permitirle prestar el servicio constante y fundamental a que está destinado ¹⁹.

La caries es una enfermedad muy antigua si bien en los tiempos primitivos la prevalencia y gravedad de la enfermedad eran casi nulas comparadas con las del hombre actual. La existencia de caries en los Australopithecus (4.000.000-3.000.000 años a.C.) y en los Pitcantropus (2.000.000-800.000 años a.C.) no ha podido ser demostrada quizás entre otras razones porque existen pocos dientes en los fragmentos de cráneos encontrados. Sí hay evidencia concreta de caries en el hombre de Neanderthal (150.000-35.000 a.C.) en forma de pequeñas lesiones. Lo que resulta un hecho cierto es que la prevalencia de caries disminuye según nos remontamos hacia atrás en el tiempo. La prevalencia de caries en el hombre primitivo era del orden del 10-15%, con la característica de que sólo unos pocos dientes estaban afectados en cada individuo. La caries empieza a aparecer de una forma significativa cuando el hombre se agrupa socialmente y esta sociedad cambia sus hábitos dietéticos ²⁰. En los siglos XVII y XVIII se produjo un aumento de la prevalencia de caries debido a que la Revolución Industrial facilitó el consumo de azúcares refinados, inicialmente en las clases sociales adineradas, y posteriormente al bajar los precios en todas las clases sociales. Hacia 1850 se redujo en Inglaterra el precio del azúcar, por cambios legislativos, aumentando el consumo per cápita de este alimento de 10 a 30 kg en sólo 50 años, lo cual se tradujo por un incremento considerable del número de caries ^{21,22}.

Estos cambios en la prevalencia de caries se han producido de distinta forma dependiendo de las culturas y las distintas partes del mundo, hasta el punto que aún hoy en día existen poblaciones que conservan su dieta primitiva cuyo índice de caries se asemeja al de los hombres de la antigüedad, como es el caso de los esquimales²⁰.

3.2.2 Etiopatogenia de la caries dental

3.2.2.1 Detalles históricos.

Se han establecido multitud de teorías acerca de la etiología de la caries responsabilizando tanto a agentes internos propios del diente y del organismo, como a agentes externos variados. Prevalen aquellas teorías que atribuyen la caries a la acción de bacterias productoras de ácidos gracias a la metabolización de hidratos de carbono. Reconocida por Miller, odontólogo norteamericano y discípulo de Koch, en 1890, la *teoría químico-parasitaria*, constituye la base sobre la que asientan los postulados modernos sobre la etiología de la caries. La caries dental según la teoría quimioparasitaria de Miller,

"es una enfermedad infecciosa, que consta de dos estadios diferenciados, la desmineralización química de la estructura inorgánica del diente por la acción del ácido, producto de la fermentación bacteriana de los alimentos azucarados, y la acción bacteriológica basada en mecanismos enzimáticos"^{23,24}.

Históricamente debemos considerar otra fecha relevante en cuanto a la etiopatogenia de la caries y como gran avance de la odontología, el año 1924, cuando el científico inglés Clarke logra identificar entre los microorganismos presentes en lesiones cariosas incipientes una bacteria de forma esférica que describió como “*opaca, marronzca, de forma redondeada, con un centro luminoso y apariencia pilosa*”. Esta bacteria no había sido descrita anteriormente en la literatura científica, y la llamó, por su extraño y novedoso aspecto, *Streptococcus mutans (mutante)*²⁴.

Debido a varios estudios realizados en esa etapa, se comenzó a producir una gran controversia entre los grupos que sostenían que el *Lactobacillus acidophilus* era la bacteria causal de la caries y los que comenzaban a identificar al grupo Streptococcus como la bacteria responsable de la caries. Con el tiempo y gracias a diversos análisis bacterianos cuantitativos pudo conocerse la escasez de Lactobacillus en la cavidad oral, en comparación con un sinnúmero de otros microorganismos acidogénicos. La creencia constante del Lactobacillus como agente etiológico de la caries perdió fuerza, lo cual marcó el final de lo que es conocido en bacteriología como la “era del Lactobacillus”. Una investigación bacteriológica de la caries iniciada por Stephan y Hewitt, en compañía con Keyes en 1959 culminó con la identificación del grupo Streptococcus como agente causal de la caries dental mediante una serie de experimentos realizados en animales de laboratorio (ratas y hamsters) libres de gérmenes que fueron obtenidos y desarrollados especialmente para estos fines. Este descubrimiento cambió el curso de la investigación cariológica orientándola hacia el esclarecimiento de la etiopatogenia de la caries, quedando el Lactobacillus como microorganismo de valor secundario en la iniciación de la lesión²⁴. En la actualidad consideramos, por tanto al *Streptococcus mutans* como la principal especie bacteriana responsable del inicio de la caries dental^{25,26}.

3.2.2.2 Aspectos generales.

La caries dental, (*Imagen 3.1*) enfermedad infecciosa de origen microbiano, se localiza en los tejidos duros dentarios. Se inicia con una desmineralización del esmalte por ácidos orgánicos, producidos por bacterias orales específicas que metabolizan los azúcares e hidratos de carbono de la dieta. El proceso biológico que se produce es dinámico, intercalándose estadios de desmineralización-rem mineralización, lo que facilita el control de progresión de la enfermedad, haciéndola reversible durante los primeros estadios ²⁷.



Imagen 3.1. Policaries dental en Odontopediatría

El estado actual de las investigaciones, ha permitido avanzar en el conocimiento de los mecanismos etiológicos más íntimos de esta enfermedad. Este hecho afecta a conceptos tan profundamente asumidos como los criterios de diagnóstico de caries, su reversibilidad en estadios iniciales y en definitiva, al convencimiento común por parte de los profesionales de que el enfoque quirúrgico-reparador no es el más adecuado para el control de esta enfermedad, el cual requiere un enfoque más amplio y más médico. La prevención y el control de la enfermedad de la caries precisa desarrollar y estandarizar nuevos protocolos de diagnóstico, evaluar el riesgo individual, determinar y detener la actividad de caries, y conseguir la remineralización de las lesiones sin cavitación ²⁸.

Hoy en día existe un consenso generalizado acerca de la necesidad de reevaluar los métodos y criterios para la detección y clasificación de las caries tanto primarias como secundarias. En realidad lo que actualmente está en cuestión son los criterios utilizados para establecer el diagnóstico correcto de caries. Este hecho es de la mayor trascendencia práctica, puesto que el diagnóstico en la práctica clínica está íntimamente relacionado con la decisión terapéutica. Así pues la decisión terapéutica debe incorporar diversos elementos diagnósticos. En primer lugar, la detección de la lesión de caries, pero también la determinación de la actividad de caries y el estadio y ritmo de progresión de las lesiones. En el establecimiento del diagnóstico de caries habrá que considerar también los factores que pueden influir en la evaluación del riesgo individual, como son la historia de caries, la utilización de fuentes de flúor, la saliva, la dieta y los niveles de *Streptococcus mutans*, entre otros. La aplicación de criterios estandarizados por los clínicos debería traducirse en decisiones terapéuticas similares. Sin embargo, varios estudios demuestran que no es así y que los índices de concordancia diagnóstica incluso entre odontólogos expertos alcanzan niveles muy bajos. Pero la estandarización de criterios debe fundamentarse también en el conocimiento de los cambios de los patrones de aparición, distribución y progresión de las lesiones de caries ^{8,28,29,30}.

La caries es una enfermedad multifactorial; es decir, no puede ser atribuida a una sola causa, sino a la interrelación de varios factores. Los tres grandes factores involucrados en el desarrollo de la caries son: el *huésped*, la *dieta* y los *microorganismos*. Se representan en forma de un diagrama, donde quedan interaccionados los tres factores entre sí. En la actualidad se encuentra vigente el *diagrama de Keyes modificado*, en el que a la triada de Keyes de los años sesenta, se le añade el menos importante factor *tiempo*^{31,32}.

Autores como Barasona²⁷ analizan todos los factores implicados en la formación de la caries dental, según la clasificación que aparece a continuación:

Etiología de la caries dental			
<i>Huésped</i>	<i>Dieta</i>	<i>Placa dental</i>	<i>Tiempo</i>
Morfología y disposición dental	Tipos de hidratos de carbono	Factores físicos (T, humedad, pH)	
Composición tejidos dentales	Concentración hidratos de carbono	Agregación salival	
Maduración	Cualidades físicas alimento	Enlace directo entre especies	
Barrido mecánico salival	Frecuencia ingesta	F nutricionales (tipo, concentración y fuente de nutrientes)	
Acción buffer salival	Factores socioculturales	Factores de inhibición de crecimiento	
Remineralización		Grado virulencia microorganismos	
Función antibacteriana			
Genética			

Tabla 3.1 Factores involucrados en la etiología caries dental (Fuente:Boj)

Analizaremos seguidamente de forma concisa todos los factores responsables del desarrollo de caries dental.

3.2.2.3 Factor huésped.

En cuanto al *factor huésped* se considerará no sólo el diente, elemento donde se localiza la enfermedad, sino también el medio oral, con un papel fundamental de la saliva, así como la predisposición genética del individuo. El *órgano dentario* ofrece puntos débiles que predisponen al ataque de caries:

- *Anatomía del diente.* Existen zonas del diente que favorecen la retención de la placa o cuyo acceso de saliva está limitado y por ello, están más predispuestas a la caries. Son las fosas y fisuras y las superficies proximales, especialmente en la zona cervical al área de contacto.
- *Disposición de los dientes en la arcada.* El apiñamiento dental favorece el desarrollo de la caries (**Imagen 3.2**).
- *Constitución del esmalte.* Es el resultado de la composición del fluido fisiológico que envuelve al diente durante su desarrollo; los elementos de este fluido se incorporan al esmalte por intercambio iónico y pueden provocar que el esmalte sea inicialmente más o menos resistente al ataque ácido.
- *Edad posteruptiva del diente.* La susceptibilidad a la caries es mayor inmediatamente después de la erupción del diente, y disminuye con la edad. Los dientes sufren un proceso de maduración post-eruptiva que implica cambios en la composición de la superficie del esmalte. Durante este proceso, debido al ataque ácido, buena parte de los iones carbonato de la hidroxiapatita inicial que son más solubles son sustituidos por otros iones, como el flúor, que confieren más resistencia a la hidroxiapatita del esmalte ²⁷.



Imagen 3.2. Apiñamiento dental en la arcada inferior que favorece el desarrollo de caries

Otro de los factores del huésped que requiere un cuidadoso estudio es el *factor saliva*, que interviene básicamente como un factor protector del huésped. Entre sus mecanismos se incluyen la acción de limpieza mecánica, y favorecedora de la disolución de las comidas; el efecto tampón, por la presencia de iones bicarbonato, fosfatos o urea, que tienen capacidad para neutralizar las disminuciones del pH en el medio bucal producidas por la acción bacteriana de la placa dental; propiedades antibacterianas, debidas a determinadas proteínas y enzimas: lactoferrina, lisozima, peroxidasas e inmunoglobulinas. Entre estas últimas se encuentran principalmente la IgA secretora, producida por las células plasmáticas de las glándulas salivales, entre cuyas funciones destacamos: actividad antiinflamatoria en el tejido mucoso, inhibición de la adherencia bacteriana e inhibición de las enzimas bacterianas. Por último, la saliva también posee componentes que inhiben la desmineralización dentaria y favorecen la remineralización, bien sean orgánicos (determinadas proteínas), como inorgánicos (iones flúor, calcio) ^{27,33,34}.

3.2.2.4 La placa dental y *Streptococcus mutans*.

La *placa dental*, segundo factor causante del desarrollo de caries, se define como un depósito adherido sobre la superficie dentaria, de diversas comunidades de bacterias inmersas en una matriz extracelular de polisacáridos. Sobre la superficie de esmalte recién pulida se forma rápidamente una capa orgánica acelular, constituida por glucoproteínas y proteínas. Se denomina película adquirida, y varias fuentes están implicadas en su formación: saliva, productos bacterianos y fluido gingival. A las 24 h, las bacterias se adhieren a los receptores de la película adquirida mediante adhesinas, fimbrinas y fuerzas electrostáticas. Los primeros microorganismos suelen ser bacterias cocos gram-positivos, principalmente estreptococos, posteriormente otras bacterias se adhieren sobre la superficie dentaria o específicamente a las células ya adheridas mediante un sistema de coagregación; a los 7-14 días aparecen los últimos colonizadores anaerobios estrictos. La flora de la placa varía en su composición según la superficie dentaria donde habita, de tal manera que se forman varios ecosistemas dependiendo del medio, más o menos anaerobio, y de sus nutrientes. Sin embargo, una vez establecida en un lugar, la microflora permanece relativamente estable, produciéndose la homeostasis bacteriana. Cuando existen cambios en el medio, se rompe esta homeostasis y se produce un desplazamiento de cepas bacterianas. En estas mismas superficies, en presencia de un aporte abundante de hidratos de carbono refinados, se produce un aumento de cepas cariogénicas (*Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*), que producen fundamentalmente ácido láctico, muy difícil de neutralizar, causante de desmineralizaciones del esmalte. Considerar que el *Lactobacillus acidophilus* a diferencia del *Streptococcus mutans*, coloniza primero superficies mucosas como la lengua. Además no se encuentra en cantidades elevadas en la placa bacteriana asociada topográficamente con el desarrollo precoz de caries, como son las manchas blancas, y tiene un papel más importante en lesiones de caries avanzadas ²⁷.

3.2.2.4.1 *Streptococcus mutans*.

3.2.2.4.1.1 *Características generales Streptococcus mutans*.

Los *Streptococcus* son cocos grampositivos que se asocian en parejas y cadenas cortas o largas, dependiendo del producto patológico y del medio de cultivo. Carecen de catalasa y son anaerobios facultativos; cuando se desarrollan en presencia de aire, su crecimiento se ve favorecido por una atmósfera de 5-10 por 100 de CO₂. Su tolerancia al oxígeno se debe a peroxidasas flavínicas y pseudocatalasas; sin embargo, la carencia de las mismas en algunos casos, y la producción de agua oxigenada por ciertas especies, supone un efecto enormemente tóxico que se puede prevenir añadiendo sangre a los medios de cultivo, cuya catalasa desdoblaría el peróxido de hidrógeno. Los *Streptococcus mutans* son una especie con los polisacáridos antigénicos del grupo *mutans* c, e y f. Sus colonias en agar sangre son α o γ hemolíticas y excepcionalmente β hemolíticas. Posee las enzimas GTF-I, GTF-S Y FTF, sintetizando glucanos solubles, insolubles y fructanos, además de polisacáridos intracelulares de reserva que pueden ser degradados por dextranasas, fructanasas y glucógeno fosforilasas. Presenta proteínas fijadoras de glucanos, que intervendrían en la adhesión a la película adquirida, cuando en ella existen glucanos absorbidos, y en los procesos de agregación bacteriana. También posee proteínas parietales superficiales, que pueden liberarse al medio en el curso del crecimiento bacteriano, y que se comportan como adhesinas; son conocidas, según los autores, como antígenos I/II, y mediarían la adhesión a la película adquirida en ausencia de glucanos en su superficie y la coagregación con otras bacterias, hechos que aumentarían con saliva. Esta especie sigue siendo sensible a una amplia gama de antibióticos. En los últimos años, se ha observado una lenta y progresiva pérdida de sensibilidad, y se han descrito cepas con elevados grados de resistencia a los aminoglucósidos, y tolerantes a penicilina ³⁵.

El grupo de los *mutans streptococci* incluye a las siguientes especies: *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. downei*, *S. macacae* y *S. ferus*. La primera diferenciación de las distintas cepas se efectuó a partir de su perfil de producción de bacteriocinas; posteriormente se encontró que existían ocho grupos serológicos. Los dos grandes subgrupos de *mutans streptococci* presentan respectivamente los serotipos *c/e/f* (correspondiente a *S. mutans*) y *d/g* (*S. sobrinus*). La mayoría de *mutans streptococci* presentes en la flora oral humana corresponden al *S. mutans*, mientras que el *S. sobrinus* aparece en menos individuos y en cantidades menores, estando en la mayoría de los casos asociado con el *S. mutans*. El serotipo *c* es el más frecuente en la colonización inicial, la cual se produce en función de características particulares de la saliva de cada individuo ³⁶⁻³⁹. La cariogenicidad asociada al *S. sobrinus* no está todavía muy clara: aunque algunos estudios no hallan mayor valores especialmente elevados para esta especie ^{40,41}, otros encuentran incluso mayor asociación de la prevalencia de caries y riesgo de futura patología con el *S. sobrinus* que con el *S. mutans* ^{42,43}.

3.2.2.4.1.2 Colonización inicial y transmisión vertical de Streptococcus mutans en los niños

Los factores que pueden intervenir en la adquisición de *Streptococcus mutans* en la boca de los niños han sido muy analizados pero siguen sin estar claramente definidos, como también resulta controvertida la delimitación del periodo inicial de colonización.

A diferencia de la mayoría de las enfermedades infecciosas, la caries dental es transmitida, como bien documentado está, verticalmente de la madre al hijo ¹⁹. En el primer periodo de vida del niño, cuando el niño es físicamente dependiente de la madre, la cantidad de *Streptococcus mutans* maternos constituye el factor más importante para la colonización inicial del microorganismo en la boca del niño ²⁶.

Es interesante resaltar que el niño se infecta entre los 6 y los 30 meses a través de la saliva de la madre o familiares cercanos, por lo que al menos el niño debe tener un diente para que la transmisión resulte efectiva. Se ha demostrado que el período exacto de colonización de esta bacteria es de los 19 a los 31 meses, periodo denominado "ventana de infectividad" ^{11-14, 24}. Un estudio llevado a cabo por Florio Martao y cols pretendía detectar y monitorizar el tiempo de adquisición de los *Streptococcus mutans* en una muestra de niños brasileños sanos. Los resultados obtenidos mostraban una relación directa entre el tiempo de adquisición de *Streptococcus mutans* y el número de dientes erupcionados, en especial durante la erupción del primer diente ⁴⁸. Los niños se infectan antes del primer año de edad, coincidiendo con la erupción de los incisivos ⁴⁹⁻⁵¹ por lo que el cultivo de *Streptococcus mutans* no se produce en la cavidad oral de niños sin dientes erupcionados, ya que se ha demostrado que el *Streptococcus mutans* presenta una débil capacidad de permanecer adherido a las superficies epiteliales ⁴⁸. Sin embargo, en un estudio reciente en niños entre 6 y 18 meses realizado en la isla de Saipan, el *Streptococcus mutans* fue detectado en el 70% de muestras salivares procedentes de la lengua demostrando que si es posible la colonización del microorganismo causante de la caries dental en pacientes desdentados ⁴⁵. Otros estudios sitúan la edad de infección más tardía hacia los 24 meses de edad, coincidiendo con la erupción de los molares temporales ²⁷. Tales diferencias pueden deberse a la distinta sensibilidad de las técnicas de detección bacteriana, así como diferencias entre los niños en cuanto a consumo de azúcares, hábitos de higiene y niveles maternos de *Streptococcus mutans*. Observamos así, que no existe uniformidad en relación con la edad media en que se considera que los niños adquieren *Streptococcus mutans* ²⁷.

Con todo lo anteriormente expuesto, la llamada “ventana de infectividad” quedaría en entredicho o podría ser más amplia de lo que se consideraba. Sin embargo, la posibilidad de acotar una “ventana de infectividad” durante la que es más probable que ocurra la colonización por *Streptococcus mutans* sería muy útil para la aplicación de medidas preventivas especialmente en aquellas mujeres embarazadas y madres que presenten alto riesgo de caries, donde la prevención debería empezar en la etapa pre-natal ^{24,45-47,52}; por ejemplo, la administración de una posible vacuna anti-MS sería más razonable antes de que se produjera la colonización, y con efecto durante toda la ventana de infectividad, con objeto de proporcionar a la cavidad oral anticuerpos IgA que interfieran con el establecimiento de los *Streptococcus mutans* ^{40,53}. Además se han propuesto estrategias preventivas a nivel del niño y la madre para prevenir la transmisión de bacterias cariogénicas con el uso de agentes tales como el flúor, la clorhexidina, el empleo de técnicas de instrucción en higiene oral y la masticación de chicles que incluyen distintos elementos ^{25,44,54}.

Söderling y cols demostraron que el consumo habitual de chicles por las madres, durante dos años, se asocia con una reducción estadísticamente significativa en la transmisión vertical de *Streptococcus mutans*. En un estudio posterior, los mismos autores, observaron que a los 5 años, los índices de caries de los niños cuyas madres habían masticado chicles edulcorados con xilitol, se reducían en un 70%, respecto a los niños cuyas madres habían utilizado colutorios de clorhexidina y flúor. Claramente, este hecho queda reforzado por la precoz disminución de la transmisión vertical que reduce el riesgo de caries en la población infantil ^{44,55}. Otros estudios indican que la transmisión vertical no es el único vector por el cual el *Streptococcus mutans* es perpetuado en poblaciones humanas. En estudios realizados en guarderías, muchos niños contenían genotipo del 70% de *Streptococcus mutans* similares a las madres, lo que indica que la transmisión horizontal puede ser otro vector para la adquisición de este microorganismo ^{44,56}.

La implantación de los *Streptococcus mutans* puede producirse tras una única inoculación, pero cuantas más inoculaciones se produzcan, mayor será la probabilidad de transmisión. La sacarosa, como se verá, tiende a facilitar la implantación de las bacterias porque permite la síntesis de glucanos extracelulares que posibilitan la adherencia de las bacterias a superficies colonizables. Sin embargo, en un estudio realizado en monos no se halló relación entre el consumo de sacarosa y la implantación de *Streptococcus mutans* ⁵⁷. Una vez establecidos los microorganismos en las superficies dentarias, el recuento tiende a mantenerse ⁵⁸ o aumentar en el tiempo, manteniéndose en general la misma cepa, aunque esta tendencia no se observa en todos los sujetos ^{36,38}.

En la literatura se refleja la colonización por *Streptococcus mutans* como indicador del riesgo de caries. Son muchos los estudios que señalan el hecho de que, cuanto más temprana sea la colonización por *Streptococcus mutans*, mayor es la incidencia esperada de caries ^{37,58-60}. Algunos estudios hallan que si la colonización se produce antes de los dos años de edad la aparición de caries es mucho más precoz; una vez se ha producido la colonización, los recuentos de este microorganismo van aumentando en los sucesivos cultivos según avanza el tiempo, probablemente por la difusión de las bacterias y la colonización de los dientes recién erupcionados, además de por cambios hacia una dieta con mayor contenido en sacarosa ^{37,60}.

La mayor experiencia de caries en los niños colonizados de manera más temprana se puede deber a la mayor susceptibilidad de las superficies dentarias recién erupcionadas y además suele indicar una exposición a una dieta rica en sacarosa, lo que aumenta el riesgo de aparición de patología. Gispert en un estudio realizado sobre 355 escolares entre 7 y 14 años, demuestra la correlación entre el número de colonias de *Streptococcus mutans* y la actividad de caries, a mayor número de colonias mayor incidencia de caries dental ⁶¹.

En 1996, científicos de la Universidad de Helsinki observaron que los niños sin caries, tenían niveles muy bajos de esta bacteria. En cambio, los niños con caries tenían concentraciones extremadamente altas, como unas 100 veces superiores ⁶². Sin embargo otros estudios, también han demostrado encontrar altos niveles de *Streptococcus mutans* en muestras de saliva y detectar baja prevalencia de caries en la población estudiada. Todas estas posibles variaciones se pueden justificar al considerar la importancia de los otros factores responsables en el desarrollo de la caries dental, así como condicionantes en la recogida de la muestra ²⁵. Además, se ha señalado que el grado de incremento en los niveles de *Streptococcus mutans* podría resultar más útil en la predicción de caries que la estimación de la colonización en un momento dado ⁶³.

Por último, algunos estudios señalan que la capacidad de las cepas de *Mutans Streptococci* presentes para sintetizar polisacáridos insolubles, que incrementan la adherencia de las bacterias y su acumulación en la placa de los niños, puede ser más importante para el desarrollo de lesiones que los niveles de colonización ^{41,64}, cobrando de nuevo importancia en la síntesis de polisacáridos la presencia como sustrato de carbohidratos fermentables ⁶⁵.

La detección de grupos de riesgo sería muy valiosa tanto a nivel individual como comunitario dado que la mayoría de las lesiones de caries se encuentran concentradas en un pequeño porcentaje de la población, y que parece existir además relación entre un alto índice de caries en dentición temporal, en especial caries de comienzo temprano ^{66,67}, y altos niveles de caries en la dentición definitiva ^{68,69}.

Se ha observado que los modelos para la predicción de la probabilidad de caries de comienzo temprano que sólo tienen en cuenta los valores de *Streptococcus mutans* pueden tener un alto valor predictivo negativo pero menor valor predictivo positivo: una parte importante de los niños con un nivel elevado de *Streptococcus mutans* no presenta caries mientras que por el contrario, entre los pacientes con niveles bajos de esta especie bacteriana se observan muy pocas caries ^{41, 70-72}. En general, el valor predictivo negativo de una prueba es elevado cuando la prevalencia de una patología es baja, como sucede con la caries entre los niños de nuestro país, requiriéndose en ese caso una especificidad muy alta para conseguir un adecuado valor predictivo positivo ⁷³. En general se considera que la experiencia previa de patología cariosa es el factor con mayor valor predictivo en la evaluación del riesgo de caries ^{72,74} y en los modelos que se incluye este factor junto con los mayores recuentos de bacterias éstos últimos parecen no mejorar considerablemente la predicción de caries, lo que pudiera ser debido a que estas dos variables están relacionadas entre sí, lo que anularía en parte el valor predictivo añadido del recuento de bacterias. Además, la actividad cariogénica de esas bacterias, como se ha visto, guarda gran relación con la dieta, una variable difícil de medir correctamente ⁷⁴. No obstante, la experiencia previa de patología puede no constituir un factor identificable en niños muy pequeños, que, aunque tienen riesgo elevado de caries, todavía no han tenido tiempo de desarrollar lesiones por lo que en ellos la estimación del riesgo se deberá basar fundamentalmente en aspectos dietéticos y microbiológicos ⁷⁵.

3.2.2.4.1.3 Detección de *Streptococcus mutans*

Existen diferentes métodos para la determinación de *Streptococcus mutans salivares*. Tras realizar el análisis bibliográfico, destacamos como aquellos más usados en los estudios de campo odontológico, aquellos procedimientos que analizaremos a continuación.

3.2.2.4.1.3.1 Cultivos

Son varios los estudios que consideran que los cultivos de *Streptococcus mutans* en placa del diente y en saliva están correlacionados, o al menos explican de manera similar la variación en las caries, por lo que la recogida de muestras de saliva, más sencilla clínicamente, sería suficiente a estos efectos; algunos autores sugieren incluso que las muestras salivales son más homogéneas ya que la composición de la placa difiere en las diversas localizaciones. Otros autores, sin embargo, recomiendan el estudio de los microorganismos en placa mejor que en saliva ^{45,60}.

Para el cultivo de *Streptococcus mutans* se suele utilizar el medio MSB (mitis salivarius bacitracina) selectivo para *S. mutans*, *S. sobrinus* y *S. rattus*, medio que ha sido utilizado en nuestra investigación. Se han propuesto otras diferentes modificaciones para identificar las distintas especies de Mutans streptococci o para aumentar la selectividad del medio, entre ellas el MSKB, presentado en 1991 por Kimmel y Tinanoff, que contiene agar para *Mitis salivarius*, telurito, bacitracina y además un alto contenido en sorbitol y el antibiótico aminoglucósido kanamicina ^{25,49,76,77}. Otras técnicas que se pueden utilizar, de fácil manejo pero menos económicas, son los tests CRT bacteria® y Dentocult SM detection®. Son tests preparados por distintas casas comerciales, donde tras la aplicación de una determinada cantidad de saliva y su posterior incubación podremos determinar el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *Streptococcus mutans* ^{6,26}.

También en la toma de saliva existen distintas posibilidades, pero en el caso de los niños más pequeños la dificultad principal está en la estimulación salivar; por ello se ideó el método de la recogida de saliva mediante depresor lingual estéril, presentado por Köhler y Brathall en 1979 ⁷⁸, demostrando buenos resultados en comparación con el cultivo directo de saliva tras estimulación; este método se ha utilizado en posteriores ocasiones, especialmente en lactantes y preescolares ^{41,79,80}.

El análisis del cultivo puede realizarse mediante diversas técnicas microscópicas: microscopio óptico convencional, microscopio confocal o microscopio electrónico. Existen también sistemas más complejos como el sistema Magiscan II® (Joyce-Lobel) que combinan técnicas microscópicas con sistemas computerizados ⁷⁷. Aunque la mayor parte de los estudios encuentra resultados reproducibles en los cultivos para *Streptococcus mutans*, hay que tener en cuenta que se pueden encontrar variaciones en un mismo individuo a lo largo del tiempo, incluso en un mismo día en función de las ingestas de comida ^{63,81,82}.

3.2.2.4.1.3.2 Identificación de cepas mediante técnicas de biología molecular y celular

Entre las primeras técnicas para la identificación de cepas figuran las basadas en los diferentes perfiles de producción de bacteriocinas y en la detección de antígenos de la pared celular. Posteriormente se han utilizado métodos genéticos, como la técnica de análisis con endonucleasa de restricción (REA), el método de "hibridación en damero" o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ^{44,83,84}.

3.2.2.5 Sustrato

Los *Streptococcus mutans* y el resto de microorganismos responsables de la caries dental dependen de un sustrato externo, consistente en la *ingesta principal de azúcares o hidratos de carbono*. De estos azúcares o hidratos de carbono, la sacarosa es el más cariogénico. La sacarosa, es capaz de producir energía y polisacáridos extracelulares que se adhieren a la placa dental, generándose ácido como producto colateral de este metabolismo ^{27, 85-7}.

Para controlar el factor dieta, los odontólogos recomiendan sustituir la sacarosa por otros edulcorantes no cariogénicos, estableciéndose uno de los pilares más importantes en la prevención ⁸⁸.

No todos los hidratos de carbono tienen el mismo potencial cariogénico. En general, la sacarosa presente en el azúcar común, frutas, dulces, golosinas, etc. es el más cariogénico. Los monosacáridos (glucosa, fructosa, lactosa) presentes en frutas, miel, leche, etc. tienen menos poder cariogénico. Los grandes polisacáridos, como el almidón, tienen capacidad cariogénica relativamente baja ²¹.

Pero, es importante relacionar el consumo de hidratos de carbono y caries dental teniendo en cuenta además el tipo de alimento del que forman parte y el procesamiento industrial de los hidratos de carbono complejos. Este proceso produce la hidrólisis parcial de las largas cadenas hidrocarbonadas, que favorece la acción sobre ellas de la flora oral, que las utiliza como sustrato para producir ácidos. Los alimentos que contienen almidón hidrolizable en combinación con sacarosa u otros azúcares incrementan su potencial cariogénico, debido a que el almidón prolonga el tiempo de retención del alimento en la boca e incrementa la producción de ácido. La forma física del alimento también influye en su cariogenicidad (el almidón cocido es más cariogénico que el almidón crudo). Por lo tanto, la diferenciación entre glúcidos simples cariogénicos y glúcidos complejos no cariogénicos no es tan clara ya que los procesos industriales pueden degradar a los almidones haciéndolos más vulnerables a las bacterias ²¹.

En los países industrializados existe una tendencia a sustituir las comidas principales por un patrón de toma de tentempiés, sobre todo en niños y adolescentes. Se ha incrementado el consumo no sólo de golosinas y dulces, sino también de patatas fritas y otros aperitivos salados obtenidos a partir de almidones de distintos orígenes (trigo, maíz, etc.) mediante procesos industriales que pueden producir la acidificación de la cavidad oral ^{21,88,89}.

Es importante desde estadios precoces evitar el consumo de alimentos potencialmente cariogénicos, dentro de la alimentación del niño. Las recomendaciones dietéticas deben ser realistas y siempre basadas en los comportamientos dietéticos de la familia. Hay un consenso profesional en el que las recomendaciones dietéticas deben ser dadas por el odontólogo al niño y a sus padres. La educación nutricional se consigue enseñando a los padres la importancia de reducir el consumo de azúcar y dulces. Sin embargo, aunque la educación es necesaria, no siempre resulta suficiente para cambiar los hábitos dietéticos ^{88,89}.

Una vez que el niño comienza a recibir gran variedad de alimentos (a partir del año o año y medio ya se han introducido casi todos los alimentos y el niño va incorporándose paulatinamente a la dieta familiar), el análisis de la dieta y su potencial cariogénico resulta mucho más complicado. Es importante recordar que estudios epidemiológicos clásicos, como el *estudio Vipeholm*, sobre la relación azúcar-caries, establecieron que la cantidad de azúcar no es tan importante en la formación de caries como su forma de presentación (más o menos adherente) y la frecuencia y el momento de la ingesta (mayor cariogenicidad si se consume entre las comidas) ⁹⁰. En cualquier caso, la determinación de la cariogenicidad de los alimentos resulta muy complicada y en realidad sólo podría ser establecida mediante determinación experimental, asociando caries con un alimento determinado, lo que resulta impracticable en humanos por motivos éticos. Lo que sí se ha definido es el "potencial cariogénico" como la capacidad de los alimentos para fomentar caries bajo condiciones predisponentes a la misma, que se determina midiendo los perfiles de pH en la placa, utilizando como referencias positiva y negativa la sacarosa y el sorbitol respectivamente, o mediante estudios en animales en los que se puede controlar la frecuencia de exposición a los alimentos ⁹⁰.

3.2.2.6 Factor tiempo

De todos los factores anteriores analizados se puede deducir que el tiempo de interacción entre ellos constituye una pieza clave en el proceso carioso. Por ello, a la clásica representación de Keyes de los factores etiológicos de la caries como tres círculos que se entrelazan (huésped, sustrato y placa bacteriana) habría que agregar un cuarto círculo correspondiente al tiempo ²⁷.

Cuando hablamos de tiempo de interacción nos referimos a que el sustrato debe permanecer el tiempo suficiente en relación con el diente, para mantener un medio ácido constante en la placa de forma que produzca la desmineralización del esmalte. También hay que tener en cuenta que cuanto más tiempo permanezca el sustrato en contacto con la placa bacteriana, más aprovechamiento pueden obtener de él los microorganismos para fabricar a sus expensas polisacáridos extracelulares adhesivos que les aseguren su permanencia en dicha placa. La necesidad de una adecuada higiene dental para la remoción de la placa inmediatamente después de la ingesta se hace evidente ante la contundencia de estos hechos ⁸⁵.

3.2.3 Riesgo de caries

La selección de criterios para evaluar de forma comprensiva el riesgo de caries de una población presenta aspectos discordantes entre autores. Valorando esta perspectiva admitimos que la ausencia total de riesgo es imposible, ya que el inicio y el desarrollo de las condiciones patológicas dependen del equilibrio de los diversos factores implicados para su desarrollo; de este modo, se hace difícil establecer un modelo de predicción ⁹¹.

El concepto de valoración del riesgo de caries es simple y sencillo. El odontólogo, conociendo los factores etiológicos de la caries dental, debe ser capaz de diagnosticar aquellos pacientes que presenten un alto riesgo de caries, o aquellos que tengan un alto potencial de contraer la enfermedad debido a condiciones genéticas o ambientales. También debe ser capaz de conocer la actividad de caries de cada paciente, es decir, el ritmo de aparición de nuevas lesiones de caries y su evolución. Por este motivo, el tratamiento restaurador de la caries es una forma de actuación parcial de la enfermedad, pero no un elemento terapéutico por sí sólo; si no se acompaña de actuaciones que disminuyan tanto el riesgo como la actividad de caries ²⁸.

Para controlar el riesgo y la actividad de caries, el odontopediatra debe realizar revisiones al niño desde edades tempranas, sobretodo en niños con elevado riesgo de caries ⁹²⁻⁹⁴. La *Academia Americana de Odontopediatría* recomienda la primera visita dental a los 6 meses de vida para establecer hábitos de salud oral adecuados, diagnosticar la posible existencia de algún tipo de patología y especialmente ir acostumbrando al niño a las visitas odontológicas ²⁵.

3.2.4 Prevención de la caries dental.

En sentido amplio, prevención es cualquier medida que permita reducir la probabilidad de aparición de una afección o enfermedad, o bien interrumpir o aminorar su progresión. Sin embargo, la prevención en su sentido estricto comprende todo el conjunto de actuaciones aplicables en el período prepatogénico, cuando la enfermedad aún no se ha desarrollado ⁹⁶.

Hablando de prevención podríamos citar sobre el significado de esta misma palabra que aparece en el *Diccionario Odontológico de Friedenthal* :

“ Objetivo de máxima importancia en el quehacer médico, configurándose así no solamente como el arte de curar sino también de prevenir. En el actual y amplio concepto, es no solo evitar daños, sino que habiéndose éstos producido significa detenerlos o limitarlos para que no sigan su evolución y acarreen peores daños que los que ya han causado. Tan importante es este objetivo, que la odontología preventiva es rama fundamental en plena evolución ” ²⁴.

En la educación para la salud participan varias disciplinas claramente diferenciadas como las ciencias de la salud, de la conducta, de la educación y de la comunicación, que serán el núcleo básico sobre el que se sustente el programa tanto teórico como práctico de la Educación para la Salud. La aparición de muchas enfermedades que nos afectan en la actualidad es debida al inadecuado estilo de vida y a los hábitos insanos adquiridos a lo largo del tiempo. El mecanismo más eficaz que tenemos en la actualidad, para generar en las personas un cambio de actitud hacia modos de vida más saludables, es la Educación para la Salud, en todos sus ámbitos de actuación, preservando siempre el derecho fundamental de las personas de obrar en libertad, sin imposición por parte de educadores ⁹⁷.

En nuestros tiempos, la odontología se prepara para el cambio más importante, trascendente y definitivo de la historia, el cambio que nos está conduciendo de la edad de la Restauración hacia la edad de la Prevención, en la cual, se unen el desarrollo científico y tecnológico del conocimiento restaurativo al conocimiento de la etiopatogenia y tratamiento preventivo de la enfermedad que por su frecuencia y caracteres epidemiológicos constituye la verdadera razón de la existencia de la ciencia y la práctica odontológica: la caries dental ^{24,98}.

Las decisiones de tratamiento en el pasado han estado basadas en tradiciones y en la educación derivada de una era con alta prevalencia de caries. Con la baja prevalencia de caries que marcará el siglo XXI, las decisiones deberán basarse en las probabilidades de los resultados y el valor global de los mismos. Sin considerar factores más objetivos y científicamente basados en las decisiones de futuros tratamientos, continuará el sobretratamiento. Desde que conocemos que la caries progresa lentamente, en la mayoría de los casos, los esfuerzos de remineralización y los de monitorización deben ser considerados como el primer y más conservador método de tratamiento en lesiones de esmalte o de poca penetración en dentina, lo cual incluiría la sustitución del azúcar en diferentes productos de confitería como comprimidos, caramelos y chicles. Este acercamiento hacia el siglo XXI establecerá con toda seguridad las bases del tratamiento óptimo. Sin embargo, cuando una lesión cariosa ha progresado hasta el punto en que es imposible conseguir su estabilización mediante remineralización, se hace necesario eliminar aquella parte del diente que se ha deteriorado irremediablemente y sustituirla con un material de restauración. La elección del material y la técnica de preparación tienen un efecto muy considerable sobre la longevidad de la restauración, ya que del mismo dependerá la evolución del mismo diente. La estructura dental no es eterna y se debe conservar y proteger en la medida que sea posible. Debe existir una razón muy poderosa para eliminar esmalte y dentina sanos, ya que estos tejidos no se pueden recuperar nunca y la preparación de una cavidad debilita inevitablemente lo que queda de estructura dental ⁹⁹.

Una adecuada educación en higiene-bucodental en niños es deseable para que éstos adquieran desde la infancia unos hábitos saludables que prevengan posibles enfermedades odontológicas en un futuro. El odontólogo debe aplicar una estrategia preventiva individualizada, adaptada a las características de cada niño según su riesgo de caries ^{100,101}

Es importante saber que todavía en la actualidad no existen estudios prospectivos que examinen el éxito de aplicar diferentes programas preventivos considerando diferentes grados de riesgo de caries en las poblaciones estudiadas^{13,100,101}. Con el fin de desarrollar un programa preventivo individualizado en el niño, el primer paso es realizar una correcta historia clínica: valorar los antecedentes personales y familiares, determinar la estrategia en función de su estado general físico y psico-social, y la edad del paciente. A partir de estos parámetros se valoran las medidas preventivas en cada caso individualizado^{102,103}. La población pediátrica necesita un cambio de actitud del dentista, de los padres y de los educadores para motivar al niño en el cuidado de su salud oral, considerando siempre que en los últimos años esta labor se ha visto mejorada¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

3.3. SALIVA Y SALUD BUCAL.

La saliva es un líquido corporal orgánico, que constituye una de las secreciones más importantes del cuerpo humano. En el campo de la odontología, la especial relevancia de la saliva, se debe a que proporciona protección primaria natural para los dientes y tejidos blandos de la cavidad oral; además, ayuda a la masticación, deglución y digestión del bolo alimenticio ³³. Los seres humanos tenemos tres pares de glándulas salivares mayores: la parótida, la submaxilar y la sublingual, las cuales se localizan fuera de la cavidad oral y por medio de un sistema de conductos vacían en ésta sus secreciones. El 90% de esta secreción es producida por la parótida y la submandibular o submaxilar, un 5% por las sublinguales y un 5-10 % por las glándulas salivales menores. Las secreciones de cada una de las glándulas mayores varían en cuanto a su composición química. Las parótidas segregan una saliva serosa que es menos mucinosa que aquella proveniente de las otras glándulas, pero rica en amilasa. La saliva submandibular o submaxilar es más mucinosa o mucosa, y la de la glándula sublingual tiende a ser muy viscosa. Debido a esta variación en cuanto a su composición, la saliva de la boca se denomina saliva mixta. Además, la composición resultante de la saliva mixta no es la simple suma de todas las secreciones glandulares, dado que muchas proteínas de la saliva son rápidamente removidas mediante su adherencia a la hidroxiapatita de los dientes y a las superficies de la mucosa bucal. Los microorganismos de la boca y la comida también contribuyen a formar parte de la saliva mixta ¹⁰⁷.

La cantidad y cualidad de la saliva constituyen dos de los factores más importantes en la modificación del proceso de la caries dental, y que no son analizados en profundidad en la población de pacientes odontopediátricos. El análisis de propiedades salivales como el flujo salival, el pH, la capacidad buffer y los recuentos bacterianos, constituyen importantes determinantes para el mantenimiento de la salud oral de individuos de todas las edades ¹⁰⁸.

Se han descrito cuatro mecanismos de la saliva para la prevención de la caries dental: un aspecto mecánico, basado en la masticación y la autolimpieza; un aspecto químico, que permite su capacidad tampón frente a los ácidos de la placa; un aspecto biológico, con sus propiedades antimicrobianas; por último, no debemos olvidar el papel que tiene la saliva al proporcionar componentes orgánicos e inorgánicos al diente, que inhiben la desmineralización y favorecen la remineralización ^{109,110}. El odontólogo debe tener conocimiento sobre estas propiedades de la saliva para comprender el papel preventivo de la misma frente a la caries dental ^{33,109}.

La presencia de la saliva combinada con la acción muscular de la lengua, carrillos y labios, determina una acción de arrastre mecánico que hace posible la limpieza continua de bacterias y detritus con potencial patógeno, de aquellas zonas accesibles de la mucosa bucal y de los dientes. Es lo que denominamos el barrido mecánico. El tiempo de aclaración o barrido mecánico muestra grandes variaciones individuales; está claro, que la disolución lenta incrementa el riesgo de caries. A nivel químico, la saliva nos protege de la caries dental por su acción buffer o tampón neutralizante. El Ph de la saliva está próximo a la neutralidad, registrándose una media de 6'75. La saliva posee varios componentes que actúan con efecto tampón o amortiguador, es decir, que tienden a mantener el Ph constante, siendo más eficaz su actuación en la superficie del esmalte y en la matriz de la placa. Estos componentes son: el sistema bicarbonato-ácido carbónico, el sistema fosfato-ácido fosfórico, la urea salival, las proteínas salivares y la sialina ^{85,109}.

La propiedad antibacteriana se basa en un papel regulador dentro del sistema ecológico bucal, ya que si bien no consigue erradicar la abundante flora que existe en el medio oral, la mantiene en equilibrio y previene la aparición de invasores patógenos transitorios. Constituyen factores antibacterianos los siguientes elementos: lisozima, lactoperoxidasa, lactoferrina, fosfoproteínas, glucoproteínas, inmunoglobulinas y el sistema complemento ¹⁰⁹.

Otra de las propiedades de la saliva es la posibilidad de reducción de la solubilidad del esmalte, mediante los ácidos que forman la película adquirida. Ésta película, se define como una capa orgánica acelular compuesta principalmente por glucoproteínas salivales, que se depositan sobre el esmalte de una forma rapidísima en cuanto se establece el primer contacto de la saliva con el esmalte limpio. La saliva también influye en el proceso desmineralización – remineralización del esmalte, ya que permite ésta última frente a las lesiones incipientes de caries en el esmalte ⁸⁵.

3.3.1 Flujo salivar.

La cavidad bucal posee un medio húmedo; una película de líquido ocupa constantemente el espacio entre la mucosa bucal de revestimiento y los dientes. Aunque se conoce generalmente a este líquido como saliva, un término más exacto sería el de fluido bucal dado que no sólo consta de saliva, sino que también de fluido crevicular, que contiene leucocitos, los cuales pasan a través de la unión dentogingival, y además de células epiteliales descamadas ¹⁰⁷. La secreción de flujo salivar varía a lo largo del día; existe un flujo continuo de saliva sin estimulación externa y otro cuando se estimulan los receptores periféricos. Son numerosos los factores fisiológicos que influyen en la tasa de flujo (***Tabla 3.2***). Por tanto, no existe una forma única de determinar el flujo salival, ya que éste puede medirse en condiciones de reposo y en condiciones de estimulación; además, existen métodos de recogida de saliva total o glandular ³³.

Edad y sexo
Enfermedades sistémicas y medicación
Ritmo circadiano
Tamaño de la glándula
Estado emocional
Dentición
Grado de hidratación
Dieta
Estímulos mecánicos, olfativos, visuales y gustativos y duración de los mismos
Posición del cuerpo
Menarquia

Tabla 3.2 Factores que influyen en la secreción salivar (Fuente:Cuenca,1999)

Se han realizado muchos estudios para valorar como influye la secreción de saliva según individuos de diferentes grupos de edad. La mayoría de grupos comparan flujos salivares de niños y adolescentes; observándose en la mayoría de casos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la secreción. Becks y Wainwright encontraron mayores niveles de flujo en el grupo de adolescentes (10 -14 años) que en el de niños (5-9 años) ¹¹¹, sin embargo los resultados en el estudio de Lourie fueron inversos, y el grupo de niños (5-9 años) presentó los mayores niveles de flujo ¹¹². También se han realizado estudios para comparar posibles variaciones de flujo al analizar registros de saliva glandulares. Aunque en la mayoría de mediciones si se observan diferencias estadísticamente significativas, observándose mayores secreciones por la glándula parótida que la submaxilar, existen algunos estudios donde no se observan estas diferencias y en ambos tipos de glándulas la secreción es similar ¹⁰⁸.

Es importante considerar las posibles variaciones de *Streptococcus mutans* al analizar muestras de saliva en reposo y estimulada. Najlaa y cols realizaron un estudio que pretendía estudiar la variación de las propiedades salivares en un grupo de niños saudíes de edades comprendidas entre los 5 y 11 años, estudiando la relación de estas propiedades con los microorganismos orales y la sequedad de la mucosa de los labios. Se obtuvieron altos niveles de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* en saliva en reposo y estimulada ³⁴.

3.3.2 Ph

El Ph de la cavidad oral oscila, en condiciones normales, entre 6.7 y 7.5, que es el Ph óptimo para el desarrollo de la mayor parte de los microorganismos relacionados con el hombre. Sin embargo, este Ph está sometido a numerosas variaciones. En este sentido, bebidas o alimentos dulces o el metabolismo bacteriano de los carbohidratos pueden provocar descensos importantes, mientras que el metabolismo de las proteínas o condiciones de ayunas lo elevan. Es la saliva la que ejerce la función amortiguadora más importante. Los reguladores salivales contienen bicarbonatos, fosfatos y proteínas. Los bicarbonatos liberan ácido carbónico débil cuando se añade un ácido, y como éste se descompone rápidamente en agua y CO₂, que sale de la solución, el resultado no es la acumulación del ácido débil sino la completa eliminación del mismo ¹¹³.

La desmineralización se produce por la disminución del Ph de la placa, considerando el valor de Ph crítico entre valores de 5.2-5.5, con variabilidad entre individuos ^{27,90,114,115}. Cuando el Ph de la interfase acuosa empieza a disolverse nos encontramos ante una situación de Ph crítico, que aún dependiendo de las concentraciones de calcio y fosfato en la saliva, en términos generales para la hidroxiapatita se ha establecido en 5, mientras que para la fluorapatita está cerca de 4.5. Dependiendo de estas condiciones químicas, se ha demostrado que cuando el esmalte está expuesto a un tampón acuoso inorgánico a un Ph inferior a 4.5, la superficie queda grabada, dejando una lesión con la misma apariencia macro y microscópica de una erosión natural (consumo excesivo de frutas y bebidas ácidas). Sin embargo, cuando el esmalte es expuesto a un Ph en la placa entre 4.5-5.5 se forma una lesión como la caries, con una capa superficial relativamente poco afectada y una zona desmineralizada en la subsuperficie. La fase acuosa que se encuentra en contacto con la superficie del esmalte (película adquirida, placa bacteriana y saliva) sufre unos cambios cíclicos en su acidez como consecuencia de la fermentación de los hidratos de carbono de la dieta, realizada por los microorganismos de la placa. Cuando el Ph de la interfase desciende se produce el fenómeno de desmineralización, descalcificación o desestructuración de las moléculas de apatita de la superficie del esmalte. Como consecuencia tendremos:



ó



Estas reacciones químicas son reversibles y se rigen por los principios de la ley de acción de masas. Mientras persiste la acidez el Ph se mantiene bajo y el fosfato (PO_4^{3-}) tiende a reducirse en formas no aptas para volver a combinarse y formar apatita de nuevo. Por otra parte, el oxidrilo tiende a combinarse con los iones ácidos para formar agua. Cuando el ácido presente en la interfase es neutralizado por los sistemas tampón (calcio, fosfato y proteínas de la película, la placa y la saliva) se produce una acumulación de calcio y fosfatos disponibles para volver a reaccionar y hacer posible la remineralización, produciéndose a la formación de nuevas moléculas de apatita o fluorapatita a partir de los iones que procedían del fenómeno de descalcificación. Las reacciones de desmineralización-remineralización se suceden de forma cotidiana en la superficie del esmalte dental humano, sin que ello signifique el desarrollo de caries. Sólo cuando la fase de remineralización se prolonga excesivamente y de forma reiterada, por la concurrencia de factores de riesgo (acumulación de placa, ingesta frecuente de hidratos de carbono) o por el fallo de los mecanismos de defensa (capacidad buffer) acaba por manifestarse la lesión en mancha blanca ¹¹⁵.

El xilitol influye positivamente en estadios precoces de la lesión cariosa al promover los procesos de remineralización. Este edulcorante estimula el flujo salivar, que provoca aumentos de Ph de la placa y neutraliza los ácidos procedentes del metabolismo de microorganismos que aprovechan los carbohidratos de la dieta. La saliva estimulada contiene altas concentraciones de calcio y fosfato que promueve estas remineralizaciones ¹¹⁶⁻¹¹⁹.

3.4. XILITOL Y OTROS EDULCORANTES

3.4.1 Xilitol

3.4.1.1 Características generales

El Xilitol, desde hace más de 30 años, ha sido utilizado extensamente para tratar la caries dental en varias poblaciones; sobre todo en comunidades como Escandinavia, aunque es relativamente nuevo en Estados Unidos ^{120,121}. La dosis óptima para que se produzcan los resultados anti-cariogénicos, se produce considerando la masticación de 5-10 g al día de producto ¹²¹⁻¹²³. El xilitol es un pentitol que se presenta en la naturaleza en pequeñas cantidades, en levaduras, hongos, líquenes y en algunas frutas y verduras. Asimismo se forma en el cuerpo humano como un intermedio normal en el metabolismo de la glucosa en cantidades que varían desde los 5 a los 15 g diarios. Administrado por vía oral, posee una baja absorción, y se metaboliza en el ciclo pentosa-fosfato formándose agua y anhídrido carbónico. Debido a esta baja absorción, no se acumula y no alcanza altos valores de concentración en sangre ^{121,122}.

3.4.1.2 Propiedades fisiológicas

El xilitol es un producto no cariogénico, ya que no es metabolizado por los microorganismos que lo generan. Numerosos estudios clínicos han corroborado que el consumo de xilitol reduce la incidencia de caries dental, quedando demostrado su efecto más significativo: su habilidad para reducir el crecimiento y la producción de ácido por los *Streptococcus mutans*, el patógeno principal responsable de la caries. Esta capacidad no anticariogénica se apoya con otras propiedades como las que posee el xilitol para reducir la cantidad, adhesión y potencial acidogénico de la placa dental ¹²⁴⁻¹²⁷.

Las bacterias intraorales no utilizan efectivamente el xilitol como fuente de energía, ya que este poliol crea un desfavorable ambiente metabólico para el desarrollo de las mismas ^{124,128}. En comparación con otros polioles puros, la capacidad de producción de caries, sigue esta escala de valores de modo decreciente: xilitol, isomatol, sorbitol, maltitol, manitol ^{126,127,129}.

El contenido calórico del xilitol es del orden de los 10 kJ/g. El reducido valor energético se debe a que los polioles son parcialmente absorbidos en el intestino delgado. Así, una gran parte del poliol alcanza el intestino grueso, donde es biológicamente degradado a ácidos grasos, metano y anhídrido carbónico, entre otros productos. Dichos ácidos grasos son parcialmente absorbidos por el intestino grueso entrando en el metabolismo intermedio ¹³⁰. Aunque el xilitol es un producto bien tolerado, la administración oral en altas dosis, superiores a 30-40 g en una sola vez o 50-100 g/día pueden provocar diarreas temporarias debido al efecto osmótico del poliol. En individuos que ingieren dosis del orden de los 75 g/día la flora intestinal no sufre modificaciones. La tolerancia depende del modo en el cual se ingiere el xilitol, que no depende del peso corporal, sin observarse diferencias entre niños y adultos que ingieren las mismas cantidades. Una característica organoléptica importante es que su ingestión produce una sensación de frescura debido a su alta entalpía positiva de disolución ^{128,129}.

3.4.1.3 Producción.

El proceso básico de producción del xilitol, según Rodolfo Larosa, utiliza como materia prima desechos agrícolas tales como: marlo del maíz, bagaso, corteza de frutas secas (nueces, almendras, avellanas, paja, cáscara del arroz). Todos estos materiales contienen pentosanos, polisacáridos formados por unidades de pentosas (monosacáridos con 5 átomos de carbono). Por hidrólisis ácida, en condiciones moderadas, se obtienen dichas pentosas, destacando en la producción del xilitol la D-xilosa. El ácido a emplear puede ser el ácido sulfúrico, pudiendo utilizarse asimismo otros, incluso ácidos débiles. De este modo, la materia prima molida (pentosanos) se mezcla con la solución ácida y se calienta a temperatura de ebullición (100°C). Una vez efectuada la hidrólisis se obtiene la D-xilosa, la cual deberá ser sometida a la hidrogenación para llegar al xilitol. Previamente es necesario separarla del material sólido y proceder a la neutralización. Una vez neutralizado el hidrolizado se concentra y desmineraliza. Según la materia prima empleada, la D-xilosa, en este caso, se acompaña en la solución por otras pentosas (arabinosa, ribosa), las que es necesario eliminar. Esta separación se efectúa por separación cromatográfica, pasando la solución a través de una columna para tal fin. Posteriormente la solución así tratada se decolora mediante el pasaje a través de una columna conteniendo carbón activo, luego de lo cual la D-xilosa en solución se hidrogena. Esta etapa se efectúa en un reactor con vigorosa agitación, en presencia de un catalizador metálico (Ni-Raney, u otros catalizadores metálicos de paladio o rutenio) e hidrógeno. Concluida la hidrogenación la solución se filtra para recuperar el catalizador, el que será reutilizado en la hidrogenación sucesiva. En el caso que se emplee Ni como catalizador durante la hidrogenación la solución adquiere color, siendo necesario tratarla con una resina de intercambio iónico para despojarla del Ni. La solución que contiene xilitol se concentra, el xilitol se cristaliza, se separa, se seca y se envasa en bolsas o en recipientes idóneos para su almacenamiento y transporte. El producto obtenido tiene un título mínimo del 99.7% ¹²⁹.

Alternativamente, existen otros métodos para la producción industrial del xilitol:

- A través de la llamada ingeniería metabólica, mediante nuevas levaduras capaces de metabolizar la xilosa transformándola en xilitol, el que se acumula en el medio de cultivo del que será luego recuperado.
- Partiendo del ácido glucónico, el procedimiento se basa en la transformación del mismo en arabinosa, hidrogenación de la misma formándose arabitol, isomerización de este último a una mezcla de pentitoles y posterior separación de los mismos.
- Empleando como materia prima los licores al sulfito provenientes de la elaboración de pulpa de celulosa. Dichos licores contienen xilosa y ácido xilónico los cuales se separan del material original para ser refinados mediante posterior hidrogenación obteniéndose el xilitol ¹²⁹.

3.4.1.4 Usos

El xilitol se usa como edulcorante, principalmente ¹³⁰⁻¹³²:

- En productos empleados en el control de la higiene oral: pastas dentífricas y tópicos, sustituyendo al sorbitol.
- En productos dietéticos y productos para diabéticos: chicles, chocolates, caramelos, jaleas, dulces, mermeladas, bebidas, helados.
- En preparaciones farmacéuticas: pastillas, tabletas, jarabes y soluciones parenterales.

3.4.2 Sorbitol.

El sorbitol, al igual que el xilitol, es una molécula formada por 5 carbonos con poder no cariogénico. A diferencia del xilitol, que no puede ser fermentado por las bacterias orales, no es metabolizado por la mayoría de microorganismos orales, aunque es capaz de ser fermentado lentamente por bacterias de la familia *Streptococcus mutans*. De igual manera las propiedades antibacterianas del sorbitol son inferiores a las observadas en el xilitol. La dulzura del sorbitol es menor que la presentada por la glucosa y sacarosa, por lo que se hace necesario en algunas ocasiones incorporar otro tipo de edulcorante como el aspartamo para mejorar el sabor ^{131,133-135}.

3.4.3. Aspartamo

Compuesto por dos aminoácidos: el ácido aspártico y la fenilalanina. Posee un poder edulcorante 180 veces superior al de la sacarosa. Por su buen sabor y su seguridad, pese a que pierde su capacidad de edulcorar a la cocción, ha sido ampliamente aceptado por un gran número de países. Su ausencia de cariogenicidad está demostrada en estudios *in vitro*, evidenciándose la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano y de disminuir la adherencia de la placa ^{131,135-137}.

3.5. EL CHICLE COMO MÉTODO ANTICARIOGÉNICO

3.5.1 Introducción

El consumo excesivo de alimentos con alto porcentaje de azúcar, pueden crear importantes problemas de salud como la obesidad y la caries dental. Se ha estimado que en los EEUU, el 40% de los niños presentan caries dental antes de los 6 años de edad, sobre todo aquellos niños que pertenecen a grupos raciales de alto riesgo. Organizaciones nacionales e internacionales, responsables del control de la salud general y oral, han establecido recomendaciones para evitar la presencia de azúcar añadido en los alimentos que ingieren niños y adultos. La Academia Nacional de Ciencias (NAS) sugiere limitar el azúcar añadido en un 25% o menos del total de energía requerida en los macronutrientes de la dieta habitual (DRIs) ¹³⁸.

A lo largo del tiempo se han intentado incrementar diversos métodos preventivos con el fin de disminuir la caries dental. Son muy diversos los métodos que se han adoptado con este fin, entre los cuales citamos algunos como, el uso efectivo de servicios de salud, la implementación de programas en las escuelas, la adopción de prácticas de cuidados dentales, el desarrollo de los selladores de fosas y fisuras, fármacos antibacterianos de gran efectividad tópica como la clorhexidina, el fluoruro, la utilización de sustitutos de azúcares como la sacarina, el aspartamo, asulfamo y la aparición de los alcoholes de azúcar como el Lycasin®, manitol, sorbitol y xilitol ¹²⁵. Estos edulcorante, se incorporan a determinados productos comestibles, como es el caso de los chicles ^{15,133}.

Desde la antigüedad ha existido la costumbre de masticar productos diferentes a los alimentos, como las resinas de los árboles, las semillas de algarrobo o la grasa de ballena. Sin embargo, el nacimiento de la industria del chicle no se produjo hasta mediados del siglo XIX, cuando el estadounidense Curtis utilizó como base las resinas y, más tarde, la cera parafinada. Pocos años después, Adams empezó a usar "chicle" importado del Yucatán o de Belice como goma base. La nueva materia tenía dos propiedades básicas: mayor elasticidad y gran capacidad para retener el sabor, lo que permitió el lanzamiento de una gran variedad de chicles con sabores diferentes (anís, fresa, regaliz o menta). A partir de ese momento, nuevas industrias empezaron a producir chicle y el consumo se incrementó rápidamente ¹³⁹.

Hoy en día, está totalmente demostrado que el chicle masticado después de las comidas tiene acción anticariogénica ya que ayuda a neutralizar ácidos por el aumento de flujo de la saliva que provoca; si el chicle contiene xilitol suma una doble acción anticariogénica debido a las propiedades antibacterianas del edulcorante ²¹. Su efecto inhibitorio del desarrollo de la caries dental se debe a varios mecanismos: su comentado efecto antibacteriano, la capacidad de estimulación salival que permite incrementos en la capacidad buffer de la saliva, aumentos en la disolución de carbohidratos fermentables que permiten remineralizaciones del diente, sustitución de la ingesta de carbohidratos en la dieta y su capacidad de inhibición durante los procesos de desmineralización ¹⁴⁰.

Según la Declaración de Principios de la FDI, aprobada por su Asamblea General en Sydney, el 18 de Septiembre de 2003, el mantenimiento de la habilidad para masticar tiene beneficios importantes no sólo en relación con la digestión de los alimentos, sino también porque contribuye al bienestar físico y mental ¹⁴¹ :

- La masticación estimula el flujo de la saliva, la que contiene compuestos que mantienen la salud de los tejidos orales y protege además al organismo contra agentes patógenos.
- Se ha demostrado que la masticación aumenta el flujo sanguíneo en el cerebro y estimula la actividad neural central. Las consecuencias o resultados no son muy claros y tienen que ser investigados más a fondo.
- La discapacidad masticatoria puede estar relacionada con complicaciones emocionales y físicas.

Por los motivos anteriores, los dentistas y los pacientes tienen la responsabilidad de contribuir a la salud general mediante el mantenimiento de la función masticatoria.

3.5.2 Impacto económico del consumo de chicles en España.

Podemos conocer el estado del consumo de chicles en España según estudios realizados por la Asociación Española de Fabricantes de Caramelos y Chicles (CAYCHI). En una encuesta realizada por esta Asociación en el año 2006 se comprobó como el 50,6% de la población española consume chicles y de estos consumidores un 70.1% prefieren chicles sin azúcar; el consumo indiferente de chicles con o sin azúcar se sitúa en el 15,2%, mientras que el consumo únicamente de chicles con azúcar es del 14,6% ^{142,143} .

Otro dato de interés a valorar es la frecuencia del consumo de chicles; un 41,5% de los consumidores consume chicles cuatro o más veces a la semana, entre los que un 18,6% los consume a diario. Un 43,2% de consumidores toman chicles de una a tres veces por semana y sólo un 13,3% los consumen con menor frecuencia. Por franjas de edad, el consumo de chicles aparece claramente ligado a la juventud de la población. Un 78,3% de los adultos de entre 16 y 25 años consume este producto, un porcentaje que se reduce progresivamente en las siguientes franjas de edad. Por sexos, las mujeres vuelven a aparecer como mayores consumidoras de chicles que los hombres, con una diferencia de porcentaje similar al caso de los caramelos. Al analizar el factor sabor, los consumidores de chicles prefieren claramente la menta (74,9%). La fresa es el sabor favorito para un 48,0% de consumidores, seguida a mayor distancia por la clorofila (25,1%) y la hierbabuena (14,6%). El análisis por edades presenta unas preferencias de consumo muy similares en todas las franjas, con un mayor consumo de chicles de fresa por parte de la población más joven. El único cambio entre los sabores preferidos se observa en la franja de entre 56 y 65 años, que sitúa a la hierbabuena como el tercer favorito, por delante de la clorofila. Por sexos, tampoco se observan diferencias destacables. Dentro de los caramelos y chicles funcionales, también debe recordarse la importancia de la nutrición y la salud. El informe de la Asociación Española de Dietistas y Nutricionistas reconoce la importancia de “los caramelos y chicles sin azúcar, en los que se han reemplazado los carbohidratos por edulcorantes con muy bajo aporte energético (como el xilitol y el sorbitol, que no son cariogénicos y aportan sensación de frescor)” ^{142,143}.

En los Países Escandinavos se realizan importantes campañas de prevención frente a la caries dental, destacando programas que incluyen la masticación de chicles edulcorados con xilitol. En España estamos “a años luz”, de realizar campañas de este tipo. Pero conociendo los elevados niveles de consumo de chicles no se hace difícil proponer este tipo de programas.

Al analizar este aspecto es importante considerar la relación coste-beneficio de los programas de prevención con chicles. En la mayoría de los estudios, los chicles se reciben como donaciones de empresas; considerando el interés especial de padres y cuidadores, los niños continúan en casa con el uso de los chicles tras el estudio ^{125,144,145}.

3.5.3 Valoración efecto anti-caries del chicle: efecto masticación vs efecto polialcohol.

Los chicles han obtenido un interés especial por la estimulación salival y la disminución de la producción del ácido láctico provocado tras el metabolismo de los edulcorantes, ayudado por la capacidad buffer de la saliva ^{15,146-149}. Por este motivo, el uso regular de chicles con polialcoholes induce cambios dentinales, que en estudios histológicos y fisicoquímicos demuestran procesos de mineralizaciones y remineralizaciones de lesiones de caries ¹⁷. En un primer momento se atribuyó a los *chicles sin azúcar*, con xilitol o sorbitol como sustitutos de la sacarosa, la capacidad de disminuir o no producir ácidos como el principal mecanismo de prevención de la caries. Hoy por hoy, son muchos los autores que señalan que el efecto de la masticación *per se* no debe ignorarse. Ambos tipos de chicles, azucarados y no azucarados, estimulan el flujo salival, produciéndose un aumento de la capacidad tampón, el aclaramiento del azúcar y la remineralización ^{89,124,150}. La hipótesis de que masticar es uno de los factores más importantes de la prevención de la caries, se confirma si consideramos el tiempo de masticación del mismo que sea como mínimo de 20 minutos. Este tiempo será suficiente para que todos los ingredientes solubles sean masticados fuera del chicle, dejando la acción de masticación a los remanentes insolubles. Su estimulación salivar constituye el factor principal en el proceso de neutralización de la placa y la remineralización temprana de lesiones superficiales ¹⁵¹.

3.5.4 Efectos de la masticación de chicles sobre la placa dental

La masticación de chicles edulcorados con xilitol y sorbitol producen una disminución de la placa dental ¹⁵²⁻¹⁵⁷. Conviene destacar el importante papel que tiene el xilitol, con su capacidad de reducir poblaciones de *Streptococcus mutans* de la placa, que se encuentra adherida en las superficies dentales. Este efecto se produce en función de la frecuencia de masticación y los niveles iniciales de esta especie de microorganismos, y puede prolongarse hasta un tiempo posterior, una vez se deja de masticar estos tipos de chicles ^{153,158}. En la mayoría de estudios realizados, y considerando que se pueden analizar las colonias de *Streptococcus mutans* en placa y saliva; se observan en líneas generales mayores reducciones de los niveles de *Streptococcus mutans* en saliva de pacientes que masticaban chicles edulcorados con xilitol, que en la placa. Comparando el tipo de edulcorante, los resultados en la reducción de *Streptococcus mutans* son mayores cuando se mastica xilitol que sorbitol. En un experimento de 3 meses de duración, donde los participantes masticaban diariamente 4 chicles edulcorados con xilitol no se mostraron reducciones en los niveles de *Streptococcus mutans* en la placa dental ¹⁵⁹. De igual modo, existen también experimentos donde después de masticar tres chicles diarios de xilitol, durante un periodo de 1 mes tampoco se observan disminuciones de los niveles de estos microorganismos en saliva ¹⁶⁰. También se han realizado experimentos donde no se han encontrados diferencias estadísticamente significativas, tras la masticación durante dos semanas de chicles con xilitol y/o sorbitol en cuanto a la reducción de *Streptococcus mutans* en placa y saliva ¹²⁷.

Observando las distintas evoluciones que pueden ocurrir tras la masticación de chicles, resulta difícil establecer cuando se produce la mayor o menor reducción de placa y/o saliva, aunque si queda claro que el tipo de edulcorante y concretamente el xilitol, es el que mejores resultados presenta.

En general, debemos de considerar que además del propio edulcorante es importante considerar determinados factores como el estatus socio-económico de la población, riesgo de caries, hábitos dietéticos y de higiene oral y grados de motivación en la participación del programa ¹⁵³.

3.5.5 Efectos de la masticación sobre la capacidad de remineralización.

La remineralización como consecuencia de la masticación de chicles con polialcoholes se ha analizado en muchos estudios, aunque las evidencias clínicas obtenidas resultan poco claras. En el estudio de Turku se establecieron tres grupos de estudio: uno que masticaba chicles con sacarosa, otro con fructosa y el último masticaba chicles con xilitol. En el último grupo la prevalencia de caries disminuyó de índices de 0.8 a 0, tras tres meses de tratamiento, interpretándose estos resultados como procesos de remineralización. Sin embargo, también observaron debajo de las remineralizaciones pequeños defectos estructurales tras minuciosas observaciones clínicas y radiográficas. En un estudio paralelo, de características similares, no se observaron remineralizaciones de superficies tras la masticación de chicles con xilitol durante 1 año. Sin embargo en esta investigación no se apreciaron desmineralizaciones y remineralizaciones, por lo que no quedó claro si el incremento negativo, a pesar del tratamiento se debe al aumento del número de remineralizaciones o a la disminución del número de desmineralizaciones o a ambos ¹⁵³.

En el estudio de Belize realizado en poblaciones de individuos de más corta edad, se observó de un 10-27% de lesiones dentinales. La masticación de chicles con xilitol 5 veces al día obtuvo mejores resultados en remineralizaciones que aquellos individuos que masticaban con menos frecuencia o masticaban chicles edulcorados con sorbitol. Sin embargo el tipo de lesión observada en las caras oclusales era similar entre los grupos del estudio, concluyendo que era el efecto de la masticación en sí y no propio azúcar el responsable de los cambios clínicos de la remineralización ¹⁶¹. En un estudio realizado por Manning y cols para comparar la remineralización de lesiones incipientes en la superficie del esmalte, tras la masticación diaria de 5 piezas de chicles con sorbitol o una mezcla de sorbitol-xilitol, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tras el análisis mediante técnicas microradiográficas ¹⁵⁰. Lijima y cols realizaron un estudio para valorar la capacidad de remineralización de superficies desmineralizadas mediante la masticación de chicles que contenían fosfoproteínas ricas en caseína y fosfatos cálcicos. Tras la masticación de chicles que contenían estas sustancias se produjeron remineralizaciones importantes que aumentaron la resistencia de los participantes del estudio al ataque ácido ¹¹⁹. Manton y cols también destacan la importancia de las fosfoproteínas ricas en caseína y fosfatos cálcicos en un estudio realizado para comparar los distintos grados de remineralización producida en distintos tipos de chicles. El chicle que contenía en su composición esta sustancia, presentaba mayores niveles de remineralización que los otros dos ¹⁸.

3.5.6 Características generales de los chicles con xilitol

El xilitol, polialcohol de 5 carbonos, ha obtenido una considerable atención como agente anticaries durante las últimas décadas ¹⁶²⁻¹⁶⁴. En Septiembre de 1890, Dr Fischer aisló de la madera de haya un compuesto nuevo al que llamaron *xylit* (xilitol en alemán). Más tarde, en 1902 el Dr Fisher fue premiado con el Premio Nobel de Química por su aportación a este campo. Casi simultáneamente, Bertrand consiguió aislar jarabe de xilitol tratando avena y centeno. Por consiguiente, el descubrimiento del xilitol se debe a dos grupos de investigadores. Considerado como agente no cariogénico, el xilitol se incorpora como edulcorante en chicles para el cuidado de la salud bucal ¹⁶².

Los primeros estudios del papel preventivo de los chicles frente a la caries dental datan de los años 70 ¹⁶⁵. Las propiedades de prevención y particularmente la remineralización efectuada por el xilitol, fue demostrada en Finlandia por *Turku Sugar Studies* entre 1971 y 1973; desde entonces se han realizado muchos estudios, en diversos países, que confirman dichas propiedades. Todas las asociaciones dentales nórdicas han recomendado el consumo diario de chicles con xilitol para prevenir la caries dental. En Finlandia se ha recomendado el consumo diario de chicles con xilitol dentro del cuidado de la salud bucal, y muchas compañías comerciales han incorporado el consumo de chicles con xilitol en la prevención de la caries dental ¹⁶. Recientemente, el *Instituto Nacional de Salud de los EEUU* ha elaborado un informe que apoya el uso de chicles con polialcoholes porque constituye una importante medida preventiva de la caries dental ¹⁷.

El *Comité Científico sobre Productos Medicinales y Consejos Médicos de la Comisión de la Unión Europea* ha confirmado durante los últimos años el importante efecto anti-caries de la masticación de chicles con edulcorantes no cariogénicos. Este papel se ha confirmado tras la realización de estudios de campo donde niños y adultos mastican chicles edulcorados con xilitol y sorbitol principalmente. En la mayoría de los estudios realizados, el xilitol es el que presenta mejores propiedades anti-caries. Aunque el mecanismo de acción no está del todo claro, los beneficios del xilitol se basan principalmente en impedir el crecimiento y metabolismo bacteriano, la disminución de la adhesión de bacterias y la formación de ácidos ^{127,163,166}. No se conoce ciertamente si la prevención de la caries con la masticación de chicles con xilitol, se debe a la sustitución del azúcar por sí o bien a la estimulación salival ^{89,145,162,167}. En un estudio realizado en Estonia para valorar el efecto preventivo de la caries al añadir xilitol a caramelos y chicles en una muestra de niños de una media de edad de 10 años, se observó tras tres años de estudio, que los niveles de incidencia de caries eran menores en aquellos niños que habían recibido tres dosis al día (4 -5 gr diarios) de caramelos o chicles con xilitol, frente al grupo control que no había recibido ninguna dosis de xilitol ¹²⁴. Resultados similares se obtienen en el estudio llevado a cabo por Van Loveren y cols ^{89,144,145,153}. Dependiendo del porcentaje de xilitol en los chicles se obtienen distintos resultados ¹²⁴.

Una de las principales propiedades de los chicles con xilitol se basa en la capacidad de disminuir los niveles de *Streptococcus mutans* en la placa dental y la saliva ^{168,169}. El consumo durante 14 días de chicles que contienen una cantidad diaria de 5 gr de xilitol reduce la producción de ácido láctico en la formación de la placa supragingival de caries activa en niños pre-escolares ¹⁶⁹.

3.5.3.1 Cantidad, frecuencia y tiempo de tratamiento necesarios para la obtención del efecto anti-caries

En la mayoría de estudios se refieren determinadas dosis, frecuencias y tiempos para que el xilitol resulte eficaz en la prevención de la caries dental. El estudio de Kandelman y Gagnon establece como mínimo dosis de 0.9g de xilitol en los chicles para obtener una suficiente prevención de la caries, mientras que el estudio de Ylivieska considera necesario 7 g de xilitol ¹⁷⁰. Incluso en estudios que comparan combinaciones de azúcares - sorbitol y/o xilitol-, como el estudio de Belize, individuos que masticaban entre 2 y 6 g de producto, no presentaban diferencias estadísticamente significativas en la reducción del riesgo de caries ¹⁶¹. Ly y cols consideran que el consumo de menos de 5 g de xilitol al día, resulta poco efectivo en la prevención de la caries y su efecto resulta similar a la masticación de chicles con sorbitol solo. Los mejores resultados se obtienen si se mastican de 6 a 10 g de xilitol repartidos en tres periodos diarios ¹²².

En la mayoría de investigaciones, los participantes mastican entre 3 y 5 chicles diarios. De hecho, en un estudio en los que los participantes masticaban 2 chicles que contenían sólo sorbitol, no se encontró el efecto de inhibición de la caries ¹⁷¹. En el estudio de Ylivieska, sólo 3 chicles al día ofrecían protección ¹⁷⁰. En el estudio de Belize no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en la reducción de la caries en individuos que mastican tres o cinco chicles diarios ¹⁶¹.

Los niños participantes en el estudio de Belize fueron reexaminados a los cinco años, después de dos años de tratamiento con chicles, observándose menos caries que en el grupo control, y sobre todo en el grupo que masticó chicles con xilitol. También tener especial consideración que la menor incidencia de caries también se producía en dientes que habían erupcionado durante este periodo ¹⁷². Esta continuidad del efecto preventivo del xilitol, a pesar de la supresión del tratamiento, se observa también en estudios como los realizados por Alenen y cols. Este efecto queda justificado por la capacidad del xilitol para producir cambios en la homeostasis de la placa dental y su influencia en el proceso de cariogénesis. Se especula que las propiedades adhesivas del *Streptococcus mutans* disminuyen a pesar de las exposiciones y adaptaciones al xilitol ¹⁴⁴.

La dosis y frecuencia óptima para que el xilitol produzca un resultado correcto no se ha establecido. Este hecho se debe a que no se han realizado suficientes estudios prospectivos correctamente diseñados para determinar a partir de que dosis mínima efectiva y con que frecuencia se pueden obtener los mejores resultados. Se hace necesario por tanto desarrollar estudios que estudien las relaciones dosis-respuesta y frecuencia-respuesta para obtener nuestro propósito ¹²².

3.5.3.2 La adaptación de los Streptococcus mutans al xilitol

Las exposiciones frecuentes del xilitol pueden aumentar la cantidad de especies de *Streptococcus mutans* xilitol-resistentes, que sufren una adaptación por mecanismos bioquímicos, sin implicar un riesgo para la formación de ácidos pero minimizando la acción del xilitol ¹⁵³.

Trahan y cols observaron que la proporción de *Streptococcus mutans* xilitol-resistentes no aumentaron en placa, pero si en saliva. El motivo, se justifica por observaciones realizadas donde se las especies xilitol-resistentes o xilitol-adaptadas se adhieren con mayor facilidad a la superficie dental que las especies xilitol-sensibilizadas. Consecuentemente, esta explicación frecuentemente se emplea para explicar la reducción de la formación de la placa dental y la consiguiente reducción de *Streptococcus mutans* después de un periodo de ingesta frecuente de xilitol. Sin embargo no existen evidencias directas que indiquen una reducción estable sobre las propiedades adhesivas del *Streptococcus mutans* después del uso del xilitol ^{166,173}.

3.5.3.3 El uso del chicle edulcorado con xilitol en mujeres embarazadas

El profesional debe tener en cuenta la posibilidad de transmisión de *Streptococcus mutans* de la madre al niño, por lo que los chicles pueden usarse también en las madres para evitar la transmisión de microorganismos a los niños ^{55,162,174,175}. Una buena combinación de cuidados orales, incluyendo técnicas de instrucción en higiene oral, uso de geles de clorhexidina y dentífricos fluorados, resultan técnicas excelentes en la reducción de los niveles de *Streptococcus mutans* y la posterior transmisión de estos microorganismos a los niños. La introducción de los chicles edulcorados con xilitol como otra técnica que también reduce la cantidad de estos microorganismos, también se puede añadir a las anteriores estrategias para controlar el desarrollo de la caries dental ¹²².

Un estudio que se realizó en Finlandia para comparar las distintas estrategias de modificación de la transmisión vertical de *Streptococcus mutans* en niños, demostró que la masticación de chicles edulcorados con xilitol presentaban el mejor efecto. Las madres que presentaban altos niveles de *Streptococcus mutans* se sometían a tratamientos mediante barnices de clorhexidina, barnices de flúor o masticación de chicles con xilitol al 100% tres veces al día de 18 a 21 meses. Los niños de las madres que eran tratadas con chicles presentaban los niveles más bajos de la especie bacteriana, manteniéndose en niveles bajos hasta dos años después, cuando se confirmó en un estudio posterior ^{55,175}.

Se considera así, que el xilitol constituye un importante rol en la prevención de la enfermedad dental en niños recién nacidos cuyas madres presentan elevados porcentajes de *Streptococcus mutans*. Ly y cols consideran que la mejor opción en cuanto al control del porcentaje de estas bacterias se produce con el uso de enjuagues de clorhexidina al 0.12% durante dos semanas y la posterior masticación de 6 a 10 g de xilitol en periodos de 5 minutos ¹²².

3.5.4 Comparación del efecto de chicles con xilitol, sorbitol o naturales.

Los chicles que contienen sólo xilitol, sólo sorbitol o una mezcla de ambos presentan efectos beneficiosos similares sobre el control de la placa bacteriana, la respuesta acidógena de la sacarosa y los niveles de *Streptococcus mutans* en saliva ^{17,127}. Ece Koparal y cols estudiaron el efecto de chicles que contenían sacarosa, chicles que contenían xilitol y sorbitol y chicles naturales (*Pistacia lenticus*) sobre el ph de la placa. Los resultados obtenidos demostraron que el uso de chicles aumenta el Ph de la placa, sin diferencias estadísticamente significativas entre los tres tipos de chicles; obteniéndose los valores más altos de Ph en los chicles naturales ¹⁵.

Machiulskiene y cols realizaron un estudio en Lituania para comparar el efecto preventivo de los chicles con diferente tipo de edulcorante, en niños de edades comprendidas entre los 9 y 14 años. Los niños se distribuían en tres grupos, que recibían distintos tipos de chicles: el grupo 1 recibía chicles con xilitol, el grupo 2 consumía chicles con sorbitol y carbamida y el grupo 3 tomaba chicles control o naturales. Además se incorporó un cuarto grupo de niños que no recibían chicles. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de niños que recibían chicles, demostrándose por tanto que en la reducción de la caries dental influye el efecto de la propia masticación. Entre los distintos tipos de chicles el grupo que mejores resultados obtenía fue el grupo que recibió chicles con xilitol ^{15,167}. MäKinen y cols realizan un estudio, de 6 meses de duración, para investigar el uso de chicles con xilitol y sorbitol en niños de 5 años de una guardería, valorando el crecimiento de *Streptococcus mutans* y la placa dental tras la ingesta. Los niños consumían un total de xilitol o sorbitol, según al grupo de estudio al cuál pertenecían, entre 4'5 y 5 gr al día repartidos en 5 episodios: 4 en la guardería supervisados por los profesores y 1 en casa. El estudio concluye que el uso habitual de pequeñas cantidades diarias de chicles con polialcoholes como sustitutos de la sacarosa, en niños en edad pre-escolar, constituye una medida preventiva importante ya que se tienen excelentes resultados en la disminución de *Streptococcus mutans* y el nivel de placa dental ¹⁷. Koparal y cols pretendían estudiar los efectos de tres tipos de chicles, con sacarosa, con xilitol y con goma natural intentando describir la recuperación del pH de la placa dental tras el enjuague durante un minuto con una solución al 10 % de sacarosa. El estudio demuestra que el uso de cualquier tipo de chicle causa un incremento en el pH de la placa por el aumento del flujo salivar. Este aumento de flujo salivar facilita la remineralización. A pesar de ello, Koparal y cols concluyen que es preferible la utilización de chicles de goma natural porque no contienen aditivos ^{15,176}.

El objetivo principal de estos estudios es conseguir la motivación a padres, niños y cuidadores para que actúen conjuntamente en la promoción de la salud bucal del niño; siendo importante la supervisión de los adultos durante la masticación debido a la corta edad de la población estudiada.

La bibliografía consultada considera que el efecto de la masticación resulta fundamental en el control de la caries dental. El papel del xilitol, con sus propiedades antibacterianas mejora la actividad anti-caries del chicle, respecto al resto de polialcoholes. Sin embargo son necesarios realizar más estudios de campo, que demuestren este hecho ¹⁵³.

3.5.5 Uso del calcio, fosfato y flúor en los chicles

Se han realizado estudios de chicles sin azúcar, donde se ha sustituido la sacarosa por fosfato dicalcico dihidratado, y donde los niveles de prevención conseguidos no son muy elevados, salvo en el estudio de Molen & Pulsen en los que se produce una disminución en la incidencia de caries en 10% ⁴⁵. Chow y cols demuestran que los consumidores de chicles que contienen partículas de calcio y fosfatos permiten la remineralización de lesiones cariosas al aumentar el flujo salivar y producirse una recuperación del Ph ¹¹⁷. Gracias a estas propiedades, el uso de este tipo de chicle que contiene partículas de calcio y fosfato, puede usarse con efecto anticaries, aunque no se ha encontrado suficiente bibliografía que demuestre que los niveles de prevención conseguidos sean tan elevados como con el uso de chicles con xilitol.

Conocidas las propiedades antimicrobianas del flúor, ^{177,178} podemos entender los excelentes resultados obtenidos en un estudio donde se incorpora a los chicles partículas de flúor. Se realizó un estudio en una población de 10 escolares sanos, 5 niñas y 5 niños, de edades comprendidas entre los 8 y los 10 años. Los niños debían de estar 3 días sin cepillarse los dientes, y al cuarto día, realizaban durante 1 minuto un enjuague con 10 µl de solución de sacarosa al 10 %. Tras el enjuague, cada niño debía masticar un chicle durante un periodo de tiempo de 5, 10, 20, 30 o 45 minutos. A continuación se procedía a medir el flujo salivar y el pH. Una masticación prolongada del chicle resultó favorable para el aumento de la concentración de flúor en la saliva y la recuperación del pH; los mejores resultados anti-caries se presentaban a medida que aumentaba el tiempo de masticación ¹⁷⁹. Giuca y cols realizaron un estudio para valorar la capacidad de disolución oral tras la masticación de chicles y tabletas que contenían NaF. Se concluyó que ambos sistemas constituyen métodos eficaces en la prevención de la caries dental, mediante la incorporación de partículas de flúor tras el proceso de disolución bucal consecuencia de la masticación ¹⁸⁰.

Otro elemento que se incorpora a los chicles y que presenta acción antibacteriana es la clorhexidina. En varios estudios se ha observado su acción preventiva frente al desarrollo de la caries dental ¹⁸¹.

Gracias a estas propiedades, el uso de estos tipos de chicles que contiene partículas de calcio y fosfato, bicarbonato o flúor pueden usarse con efecto anticaries, aunque no exista la suficiente bibliografía como para demostrar que los niveles de prevención conseguidos, son tan elevados como con el consumo de chicles con xilitol.

3.5.6 Prevención de la caries dental con el consumo de chicles.

El consumo de chicles cómo única medida preventiva frente a la caries dental es insuficiente, ya que necesita de otros procedimientos de higiene oral, sobretodo en pacientes de alto riesgo de caries. Conviene recordar que el chicle no sustituye al cepillado, al uso de la seda dental y al resto de medidas preventivas; la prevención de la caries, se basa en la práctica simultánea de un conjunto de medidas preventivas ^{15,89}. Szoke y cols, sugieren claramente que incluso en una población con niveles moderados de caries, con la práctica de una correcta higiene oral, uso de dentífricos fluorados y con un régimen de chicles tras las comidas, puede reducirse hasta un 38'7 % las lesiones de caries. Además, si se incluían las manchas blancas, se producía una reducción del 33'1% tras 2 años de consumo de chicles ¹⁵¹.

El primer estudio comparativo entre la eficacia para la prevención de caries oclusales entre los selladores de fosas y fisuras y el uso de chicles, se llevó a cabo por Alarien y cols. Se pretendía comparar el uso regular de chicles con xilitol durante 2-3 años con la aplicación de sellados de fosas y fisuras de forma simultánea o no, aleatoriamente. Tras 5 años, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la prevención con una estrategia única con chicles, o simultánea con chicles y selladores. Tampoco se encontraron diferencias significativas a nivel de costes entre ambos grupos ¹⁸².

Debemos considerar el nivel de riesgo de caries de la población estudiada y del país de dicha población; así cómo los cuidados dentales, si son limitados o presentan refuerzo con otras medidas preventivas simultáneas ⁸⁹. La ADA recomienda el uso de chicles junto a la limpieza de dientes con dentífricos fluorados, ya que el uso simultáneo de ambos mejora los beneficios anticaries en un 10% frente al uso sólo del cepillado ¹⁸³.

El consumo de chicles debería considerarse dentro del cuidado general dental de la población infantil. Se recomienda masticar tres veces al día chicle tras las comidas, sobretodo en jóvenes y adolescentes, dentro de los programas escolares de prevención; intentando motivar a padres y educadores, para contribuir en la promoción de la salud del niño ¹⁴⁵. Los programas escolares de cuidados de salud oral con chicles mejoran la higiene oral de los niños, beneficiándose así la prevención de la caries dental ^{16,62}. La selección del programa de cuidado oral en la escuela debe realizarse teniendo en cuenta distintos factores: la prevalencia de la enfermedad en la población escolar, la disponibilidad de personal, oportunidad de costes y cooperación en las escuelas ^{62,184}.

El uso de cepillos de dientes en las guarderías ha sido cuestionado debido a la posibilidad de infecciones cruzadas, cuando se intercambian los cepillos por falta de supervisión de los educadores. Una alternativa para evitar este riesgo de infección, es incluir dentro del cuidado bucal en colegios, la masticación de chicles tras el almuerzo, pero siempre supervisando esta masticación, y evitando el intercambio de chicles ¹⁸⁴.

3.6. Actualización sobre el concepto de masticar chicles en la prevención de la caries dental.

Actualmente el consumo de chicles constituye, en la mayoría de países desarrollados, una estrategia preventiva con brillante futuro frente al control del desarrollo de la caries dental ¹⁶.

La acción preventiva de los chicles no se debe únicamente al hecho de la composición de los chicles sin azúcar; el efecto de la masticación es fundamental ^{89,125, 151}.

Masticar un chicle aumenta el flujo salival y la capacidad buffer salivar. Se produce así la reducción de la acumulación de placa, una disminución de la cantidad de *Streptococcus mutans* en placa y saliva; en consecuencia la reducción del ácido láctico producido, por lo que queda disminuida la actividad cariostática ^{89,125, 151}.

Los chicles con xilitol obtienen mejores resultados anticaries que los chicles con sacarosa, con sorbitol o el no consumo de chicles, sobre todo por la inhibición del crecimiento bacteriano y el aumento de la actividad remineralizadora del diente ^{15, 89,147,168}.

El consumo de chicles como única medida preventiva frente a la caries dental es insuficiente, necesita de otros procedimientos para el control de higiene oral. La ADA recomienda el uso de chicles junto a la limpieza de dientes con dentífrico fluorado ¹⁸³.

Los programas escolares, de cuidados de higiene oral con chicles, mejoran la salud oral de los niños, previniendo así el desarrollo de la caries dental ^{16, 62,152,167}.

SUJETOS, **M**ATERIALES, **M**ÉTODOS

5.1 INTRODUCCIÓN.

Entre mayo y junio del 2008, se realizó un estudio clínico de tipo longitudinal in vivo, de 28 días de duración en el CP Nuestra Señora de la Consolación de Vila-real (Castellón. España) que tuvo como objetivo comparar el flujo, Ph y la concentración de *Streptococcus mutans* salivares, de niños de 6 a 12 años de edad, (**Imagen 5.1**) que masticaron 3 chicles edulcorados con distintas concentraciones de xilitol y chicles que no contenían xilitol como edulcorante en su composición química. Se compararon los registros analizados en condiciones basales, con los registrados a los 14 y 28 días tras el inicio del tratamiento. La muestra estuvo constituida inicialmente por un total de 160 niños; sin embargo, el total de la misma se redujo a 145 niños debido entre otros motivos: a la interacción del tratamiento antibioticoterápico durante el tratamiento (8 individuos) , ausencia escolar durante el tratamiento (3) y ausencia escolar durante la recogida de muestras (4).



Imagen 5.1. Niños de distintas edades participantes en el estudio

Como ***variables dependientes*** del estudio consideramos:

- Flujo salivar.
- Ph salivar.
- Concentración *Streptococcus mutans* salivares.

Como ***factores del estudio*** consideramos:

- Tratamiento.
- Tiempo.

5.2 MATERIAL NECESARIO PARA EL ESTUDIO

1. Carta al colegio, incluyendo el informe de investigación o protocolo de estudio, para obtener su consentimiento informado.
2. Consentimiento informado del colegio por escrito.
3. Carta a los padres de los alumnos del colegio, ofreciendo información en lenguaje sencillo para obtener su consentimiento informado.
4. Consentimiento informado del padre o tutor legal del niño.
5. Vademécum para comprobar si algún fármaco que esté tomando el niño produce una alteración en la secreción salivar.
6. Cuestionario donde se anota la edad y el sexo del paciente.
7. 3360 chicles de 5% xilitol.
8. 3360 chicles de 30% xilitol.
9. 3360 chicles de 67% xilitol
10. 3360 chicles sin xilitol (contienen sorbitol)
11. Etiquetas de diferentes colores para dividir a los pacientes en los tres grupos de estudio (verdes, rojas y amarillas) y el grupo control (azules).
12. Plásticos para guardar las muestras.
13. Mantelitos desechables para la recogida de la muestra de saliva
14. 435 vasitos milimetrados para medir el flujo salivar.
15. 2 rollos de tira de medición de pH Pehanal® pH 1-11 (435 tiras).
16. 219 placas petri de agar Mitis Salivarius, seccionadas para el cultivo de dos muestras
17. Obsequios (pastas dentífricas, cuentos, chupa-chups, llaveros, chicles) para los alumnos por su colaboración ofrecidos por Colgate® y Chupa-Chups®.



Imagen 5.2. Materiales necesarios para analizar las variables de la investigación: vasitos milimetrados, pipetas, tiras de Ph y placas de agar.

5.3 DISEÑO DEL ESTUDIO.

En primer lugar se envió una carta al colegio, incluyendo el informe de investigación o protocolo de estudio, obteniéndose el consentimiento informado por parte de la dirección del colegio. La dirección del colegio, enviaba una carta a los padres de sus alumnos, elaborada por la investigadora, ofreciendo información en lenguaje sencillo para la obtención del consentimiento firmado por los padres por escrito (**Imagen 5.3**). Los padres de los niños participantes eran informados sobre las características del estudio, que sería realizado por una profesional odontopediatra graduada por la Universitat Internacional de Catalunya, capacitada para tal efecto y cumpliendo las normas vigentes para la realización de investigación en personas, tras la aprobación del protocolo de investigación por la Comisión de Investigación Ética del Departamento de Odontología de la Universitat Internacional de Catalunya.

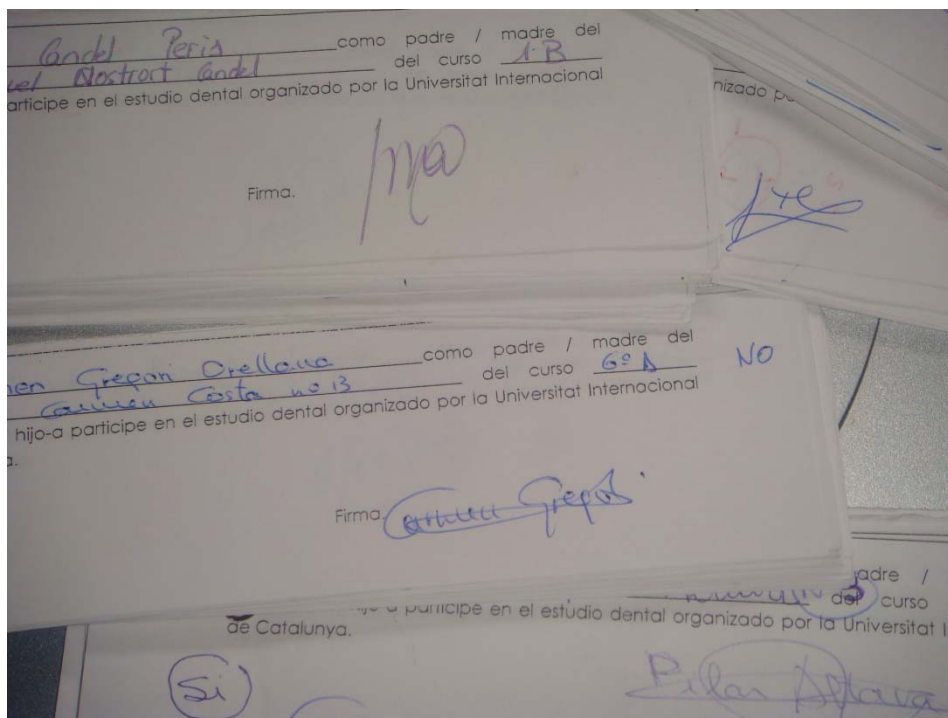


Imagen 5.3 Consentimientos firmados por los padres.

A la hora de selección de los pacientes consideramos como:

1. **Factores de inclusión:** Los individuos de la muestra son niños de edades comprendidas entre los 6 y los 12 años que estudian en el CP Nuestra Señora de la Consolación de Vila-real, que voluntariamente participan en el estudio previo consentimiento firmado por los padres.
2. **Factores de exclusión:** Niños menores de 6 años y mayores de 12 años, niños que tomen alguna medicación que se asocie con alteración salivar, niños portadores de aparatología de ortodoncia, niños que presenten algún tipo de patología del tipo psicológico, alteraciones de la marcha y/o síndromes no identificados. A la hora de firmar el consentimiento informado los padres, deberán especificar si existe alguno de estos factores de exclusión.

La muestra total se dividió en tres grupos de estudio y un grupo control:

1. **Grupo 1:** Niños que masticaron chicles edulcorados con un 5 % de xilitol.
2. **Grupo 2:** Niños que masticaron chicles edulcorados con un 30 % de xilitol.
3. **Grupo 3:** Niños que masticaron chicles edulcorados con un 67 % de xilitol.
4. **Grupo 4:** Niños que masticaron chicles no edulcorados con xilitol.

Cada uno de los grupos se identificaba con un color, como se aprecia en la siguiente figura:



Imagen 5.4. Variantes de chicles empleados en el estudio identificados con el color correspondiente del ensayo. De izquierda a derecha, y de arriba abajo: xilitol 5%, xilitol 30%, xilitol 67% y control.

A la hora de incluir a los niños en los distintos grupos se realizó de forma aleatoria considerando grupos de niños, no individualmente, debido a restricciones por parte del profesorado, pues dificultaría el rendimiento escolar, y la Junta Directiva del Colegio permitía realizar el estudio unificando a un único tipo de chicle por clase.

Finalmente los grupos de estudio, con variabilidad de género en sus integrantes, quedaban establecidos según la edad, según la siguiente tabla:

Grupo	Xilitol 5%	Xilitol 30%	Xilitol 67%	Control
Edad (años)	6 (n=21)	6 (n=21)	11 (n=17)	11 (n=12)
	10 (n=16)	10 (n=18)	12 (n=19)	12 (n=21)

Tabla 5.1. Distribución participantes por grupos de estudio y edad.

Una vez distribuidos los alumnos por grupos de estudio, la investigadora se reunió con la directora del centro y las 8 profesoras responsables de los alumnos que participarían en el estudio, para explicar que procedimientos debían de seguir para la realización del mismo. Por la normativa vigente del centro escolar, las profesoras eran las responsables de dispensar los tres chicles diarios que debían de masticar los niños participantes en el estudio, al igual que controlar la masticación de los niños durante un periodo de 5 minutos, un total de 15 minutos diarios. Es importante considerar, las dificultades que se presentan a la hora de realizar estudios de tipo in vivo, en centros escolares, por lo que, la directiva estableció necesario que los tratamientos se realizaran durante las mismas clases lectivas, por eso eran las profesoras las que controlaban el tratamiento, tras un periodo inicial de 1 semana de monitorización con la colaboración de la investigadora. La investigadora acudía al centro escolar semanalmente para controlar como transcurría el estudio.

Los distintos tipos de chicles eran clasificados en bolsas etiquetadas con el color del grupo al que pertenecían (verde, rojo, amarillo, azul), que incluían la cantidad de 3 chicles diarios necesarios para los 5 días de periodo escolar, un total de 15 chicles por niño (**Imagen 5.5**). También se entregaba a cada profesora, bolsitas individuales de 6 chicles (**Imagen 5.6**), para la continuación del tratamiento en casa, durante el fin de semana.



Imagen 5.5. Distribución de chicles en bolsas, durante el tratamiento escolar, según el grupo de participación



Imagen 5.6. Distribución de chicles en bolsas, durante el tratamiento extraescolar, para el grupo de niños que mastican chicles edulcorados con xilitol al 5%.

El tratamiento consistió en masticar 3 chicles diarios de distintas concentraciones de xilitol o sin xilitol repartidos en tres momentos, después de las comidas principales: a las 9 de la mañana, a las 11 de la mañana, a las 3 de la tarde. La profesora procedía a cada hora estipulada repartir los chicles a los alumnos y controlar su masticación durante 5 minutos. Durante el periodo de la masticación, los alumnos no debían estar realizando ninguna tarea, y debían estar relajados con la cabeza recta. A continuación un alumno encargado procedía, transcurridos los 5 minutos, a recoger con una papelera los chicles utilizados. Este procedimiento se realizaba tres veces por día.

Como se menciona anteriormente se realizaban tres registros de determinación de flujo salivar, Ph y concentración de *Streptococcus mutans*: en condiciones basales, transcurridos 14 días tras el inicio del tratamiento y transcurridos 28 días tras el inicio del tratamiento.

En cuanto los materiales utilizados para el registro de las variables se empleó vasitos milimetrados para la determinación de flujo salivar, identificados por el color del grupo de estudio y marcados por un número identificativo de individuo. El Ph se medía empleando un rollo de tira de medición de pH entre valores de 1-11 de la casa comercial PEHANAL®. Se trata de un rollo que tiene inicialmente 3 bandas de color (amarillo, blanco y verde) que cambiarán tras el depósito de una gota de saliva sobre su superficie, a otras 11 posibles combinaciones de colores, correspondientes a los 11 valores de Ph (1-11). Se procedió a cortar 435 tiras, equivalentes al total de registros de pH realizados en el estudio. Por último el Laboratorio del Área de Biología Molecular y Celular, bajo la dirección del Profesor Josep Clotet, fabricó placas de AGAR MITIS SALIVARIUS para la determinación de la concentración de *Streptococcus mutans*. Para la fabricación de estas placas se utilizó el preparado industrial DIFCO™ MITIS SALIVARIUS AGAR, que tiene un mecanismo de acción similar a los tubos CRT bacteria (Ivoclar-Vivadent®), que son más caros.

A continuación se presenta una tabla con la composición química del producto para la obtención de una fórmula aproximada por 1 L:

Digerido pancreático de caseína	6.0 g
Peptona de proteosa N°3	9.0 g
Peptona de proteosa	5.0 g
Dextrosa	1.0 g
Sacarosa	50.0 g
Fosfato dipotásico	4.0 g
Azul triptano	0.075 g
Violeta cristal	0.0008 g
Agar	15.0 g

Tabla 5.2. Composición química del preparado industrial DIFCO™ MITIS SALIVARIUS AGAR

El procedimiento de confección del agar es sencillo y se basa en seguir las instrucciones del fabricante. El profesional debe suspender 90 g de polvo en 1 L de agua purificada y mezclar bien. A continuación, se calienta agitando frecuentemente y se hierve durante 1 min hasta disolver completamente el polvo. Una vez disuelto el polvo se debe colocar la mezcla en autoclave a 121°C durante 15 minutos; se dejará enfriar a temperatura de 50-55°C y se agregará 1 mL de solución de telurito Chapman. Es importante analizar las muestras del producto final para verificar su rendimiento usando cultivos de control típicos y estables.

La recogida de muestras fue realizada por la investigadora, con la colaboración de dos compañeras farmacéuticas, calibradas y personal del centro instruido, en cada una de las 8 clases participantes en el estudio. Las profesionales acudían a cada una de las 8 clases y preparaban sobre la mesa de los niños un mantel con el vasito individualizado del niño, con color del grupo al que pertenecían y número, y el chicle requerido según el grupo de estudio. Después de explicar en lenguaje sencillo como tenían que proceder se introducían el chicle en la boca, y en posición recta y relajada masticaban durante un periodo de 5 minutos (**Imagen 5.7**). Tenemos que tener presente que previamente se realizó una prueba piloto para comprobar la posibilidad de realizar la recogida de saliva estimulada con parafina pero debido a su sabor desagradable se decidió estimular la salivación mediante el chicle que consumían según al grupo que pertenecían. Al finalizar la masticación, el alumno responsable de la papelera procedía a recoger los chicles de sus compañeros; los profesionales procedían a repartir obsequios a los alumnos. El procedimiento se repetía igualmente para cada clase en cada uno de los tres registros, en condiciones basales, a los 14 días y a los 28 días.



Imagen 5.7. Recogida de muestra de saliva.

Tras la recogida de las muestras de saliva, se acudía a la biblioteca habilitada como laboratorio provisional para realizar el análisis del flujo, Ph salivares y el cultivo de *Streptococcus mutans*. La investigadora realizaba el recuento de flujo que se anotaba en una hoja de recogida de datos. A continuación se procedió, mediante la recogida de saliva con una pipeta a realizar el test de medición de Ph con el sistema de tiras PEHANAL® cuyo mecanismo se basa en un sistema de indicadores especiales. Se humectó todo el campo activo con la ayuda de la pipeta, sin que esta tocara el campo activo; después de exactamente 5 minutos de espera, se comparó el campo activo con la muestra de colores, equivalente a los 11 posibles valores de Ph (1-11) que se observa en el mismo rollo y se anotaban los distintos valores en la hoja de recogida de datos (**Imagen 5.8**).



Imagen 5.8. Determinación flujo y Ph salivar.

Tras la anotación del registro de pH, se procedía con la ayuda de una pipeta a realizar el cultivo de *Streptococcus mutans* en una placa agar mitis salivarius. El mecanismo de estas placas es similar al realizado en estudios anteriores empleando el test CRT® usado para la determinación del número de *Streptococcus mutans* en placa y saliva, con la ayuda de un substrato selectivo, colocando una tableta de NaHCO₃ en la base del tubo para inhibir el desarrollo de otras especies bacterianas, también presentes en la saliva. A la hora de depositar la saliva sobre el agar es importante colocar en las placa la misma cantidad de saliva, 0.5 mL, medidos con pipetas milimetradas, sin arañar el agar, manteniendo la placa ligeramente inclinada. Destacar que en la misma placa pudimos cultivar dos muestras de bacterias, pertenecientes a dos individuos distintos ya que la placa estaba dividida por una separación de metacrilato central que impedía la mezcla de las dos muestras de saliva. Una vez realizados ambos cultivos se cerraba la placa y se pegaban pegatinas con el color del grupo y el número perteneciente del individuo en el estudio (**Imagen 5.9**).

Posteriormente se precintaban todas las placas para su desplazamiento al laboratorio de investigación, donde se procedía a incubar las placas durante 48 horas a 37 °C , para su posterior lectura.



Imagen 5.9. Cultivo e incubación *Streptococcus mutans* en placas con medio selectivo.

El recuento era realizado mediante la leyenda de determinación de UFC de bacterias que aparece en el kit CRT® bacteria. Se produjo una modificación de la leyenda, según criterio del responsable del laboratorio, y se establecían 4 valores (**Imagen 5.10**):

- Valor 1: $< 10^4$ UFC
- Valor 2: 10^4 UFC - 10^5 UFC
- Valor 3: 10^5 UFC
- Valor 4: $> 10^5$ UFC

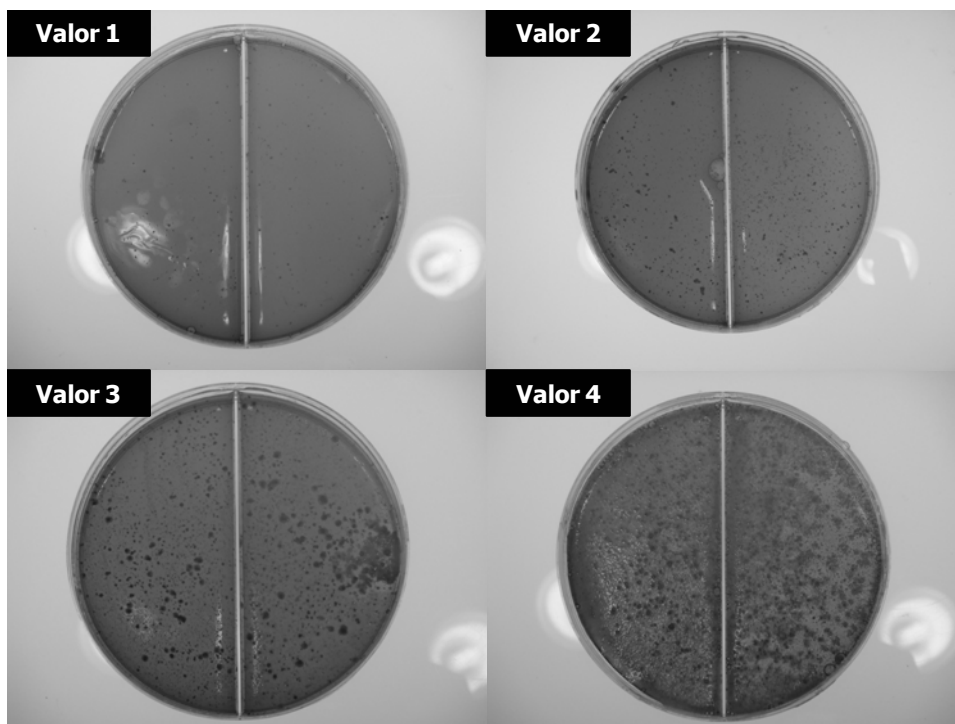


Imagen 5.10 Posibles valores durante el recuento de las UFC de *Streptococcus mutans*

Se realizaron fotografías de las placas en cada recuento, para observar cambios en los tres registros realizados. La placa se colocaba en un negatoscopio y con iluminación auxiliar se procedía a fotografiar cada placa (**Imagen 5.11**). De este modo conseguimos almacenar los datos, fotográficamente, para comparar la variable *Streptococcus mutans* en los tres registros: en condiciones basales, a los 14 días y a los 28 días.

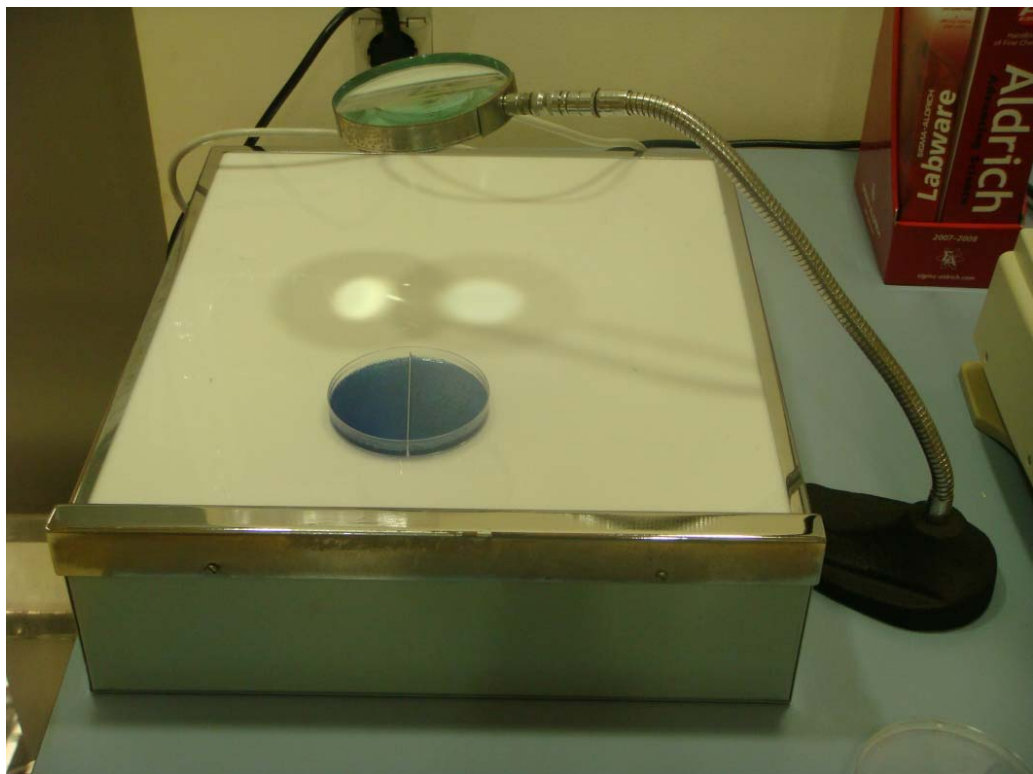


Imagen 5.11. Recuento bacterias sobre negatoscopio y ayudándonos con lupa de aumento.

Tras las lecturas las placas eran depositadas en envases de residuos biológicos para evitar contaminación bacteriana (*Imagen 5.12*).



Imagen 5.12. Contenedores de residuos biológicos donde se depositaron las placas

Una vez obtenidos los datos, se procedió al análisis estadístico mediante los sistemas estadístico-informáticos Stratgraphics 5.0 plus empleando la técnica ANOVA multifactorial y EXCEL, empleando la técnica *Split-plot*.

***H*IPÓTESIS DE TRABAJO**

1. HO El consumo de chicles edulcorados con xilitol no producen una mayor estimulación de flujo salivar y pH que aquellos que no contienen xilitol en su composición química.
H1 El consumo de chicles edulcorados con xilitol producen una mayor estimulación de flujo salivar y pH que aquellos que no contienen xilitol en su composición química.

2. HO El consumo de chicles con mayor porcentaje de xilitol no produce una mayor estimulación de flujo salivar y pH que aquellos que no contienen xilitol en su composición química.
H1 El consumo de chicles con mayor porcentaje de xilitol produce una mayor estimulación de flujo salivar y pH que aquellos que no contienen xilitol en su composición química.

3. HO La mayor estimulación de flujo salivar y recuperación de pH se produce entre los 15 y 30 días del tratamiento.
H1 La mayor estimulación de flujo salivar y recuperación de pH se produce antes de los 15 días de tratamiento.

4. HO No existen diferencias en la concentración de *Streptococcus mutans* en saliva en los individuos que consumen chicles edulcorados sin xilitol
H1 El consumo de chicles edulcorados con xilitol producen una disminución mayor en la concentración de *Streptococcus mutans* en saliva respecto aquellos que no contienen xilitol.

5. HO El consumo de chicles con mayor porcentaje de xilitol no producen una disminución mayor en la concentración de *Streptococcus mutans* en saliva .
H1 El consumo de chicles con mayor porcentaje de xilitol producen una disminución mayor en la concentración de *Streptococcus mutans* en saliva .

6. H0 La mayor disminución en la concentración de *Streptococcus mutans* se produce entre los 14 y 28 días de tratamiento.
- H1 La mayor disminución en la concentración de *Streptococcus mutans* se produce antes de los 14 días de tratamiento.

***R*RESULTADOS**

Una vez analizados los datos obtenidos mediante el sistema estadístico-informático STRATGRAFHICS 5.0 plus y empleando la técnica ANOVA MULTIFACTORIAL, procederemos a exponer cada variable relacionada con los factores tratamiento y tiempo respectivamente.

6.1 VARIABLE DEPENDIENTE FLUJO.

6.1.1 Variable dependiente Flujo Vs Factores Tiempo y Tratamiento. Medias y 95,0 porcentajes intervalos LSD.

Análisis de la Varianza para Flujo - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tratamiento	1442,65	3	480,885	29,42	0,0000
B:Tiempo	109,087	2	54,5435	3,34	0,0365
INTERACCIONES					
AB	239,421	6	39,9035	2,44	0,0248
RESIDUOS	6914,59	423	16,3465		
TOTAL (CORREGIDO)	8713,02	434			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Tabla 6.1 Análisis de la varianza para flujo.

Como observamos en la tabla superior la tabla ANOVA descompone la variabilidad de flujo en las contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha elegido la suma de cuadrados tipo III (valor por defecto), se ha medido la contribución de cada factor eliminando los efectos del resto de factores. Los p-valores comprueban la importancia estadística de cada factor. Dado que los 3 p-valores son inferiores a 0.05, estos 3 factores tienen efecto estadísticamente significativo en flujo para un 95% de confianza.

A continuación se presentan las gráficas de medias de la variable flujo, al analizarse los factores tratamiento y tiempo respectivamente:

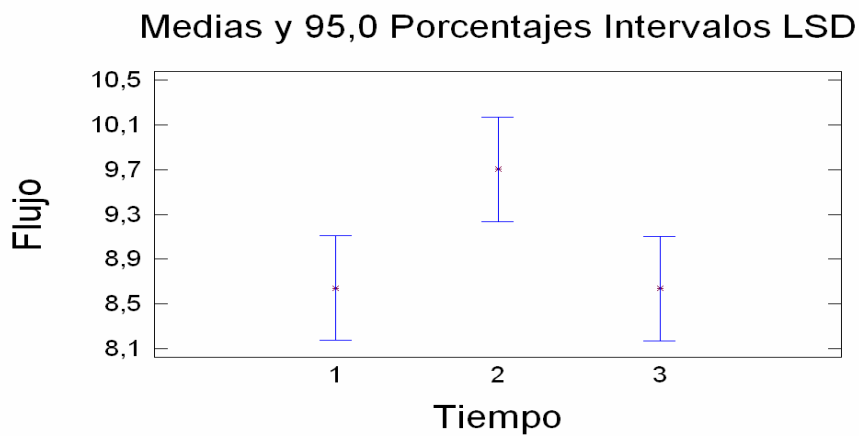


Tabla 6.2. Gráfico de medias de la variable flujo para el factor tiempo

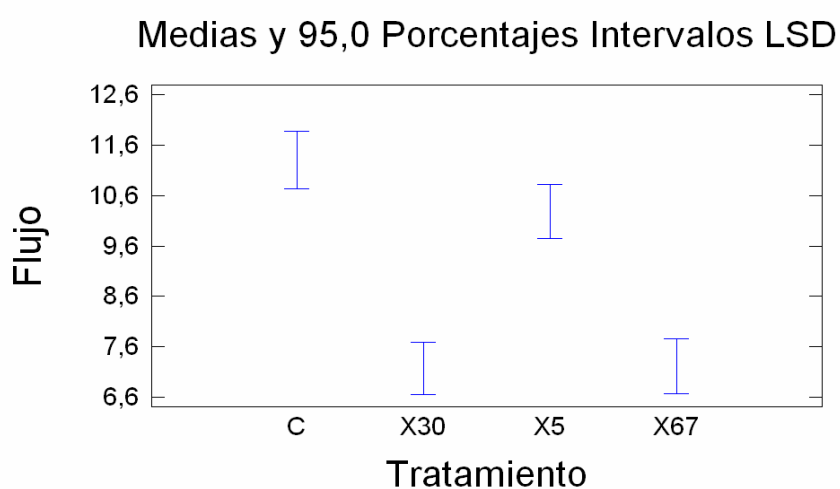


Tabla 6.3. Gráfico de medias de la variable flujo para el factor tratamiento

**6.1.2 Variable dependiente Flujo Vs Factores Tiempo y Tratamiento.
Gráfico de interacción.**

Tabla de Medias por mínimos cuadrados para Flujo
con 95,0 Intervalos de confianza

Nivel	Frecuencia	Media	Error Estándar	Límite Inferior	Límite Superior	
Media Total	435	8,99381				
Tratamiento						
C	99	11,303	0,406345	10,5043	12,1017	
X30	117	7,17094	0,373783	6,43623	7,90565	
X5	111	10,2883	0,383753	9,53399	11,0426	
X67	108	7,21296	0,389046	6,44826	7,97767	
Tiempo						
1	145	8,64141	0,336374	7,98023	9,30258	
2	145	9,7033	0,336374	9,04212	10,3645	
3	145	8,63671	0,336374	7,97554	9,29789	
Tratamiento según Tiempo						
C	1	33	11,3939	0,703811	10,0105	12,7773
C	2	33	11,4242	0,703811	10,0408	12,8076
C	3	33	11,0909	0,703811	9,7075	12,4743
X30	1	39	7,94872	0,647412	6,67617	9,22127
X30	2	39	8,17949	0,647412	6,90694	9,45203
X30	3	39	5,38462	0,647412	4,11207	6,65716
X5	1	37	8,97297	0,664679	7,66649	10,2795
X5	2	37	11,4595	0,664679	10,153	12,7659
X5	3	37	10,4324	0,664679	9,12594	11,7389
X67	1	36	6,25	0,673848	4,92549	7,57451
X67	2	36	7,75	0,673848	6,42549	9,07451
X67	3	36	7,63889	0,673848	6,31438	8,9634

Tabla

6.4. Interacción variable dependiente flujo con factores tiempo y tratamiento

Esta tabla muestra la media de flujo para cada nivel de factores. También presenta el error estándar de cada media, lo cual es una medida de su variabilidad en la muestra. Las dos columnas de la derecha muestran 95,0% intervalos de confianza para cada una de las medias, como se observa en el siguiente gráfico:

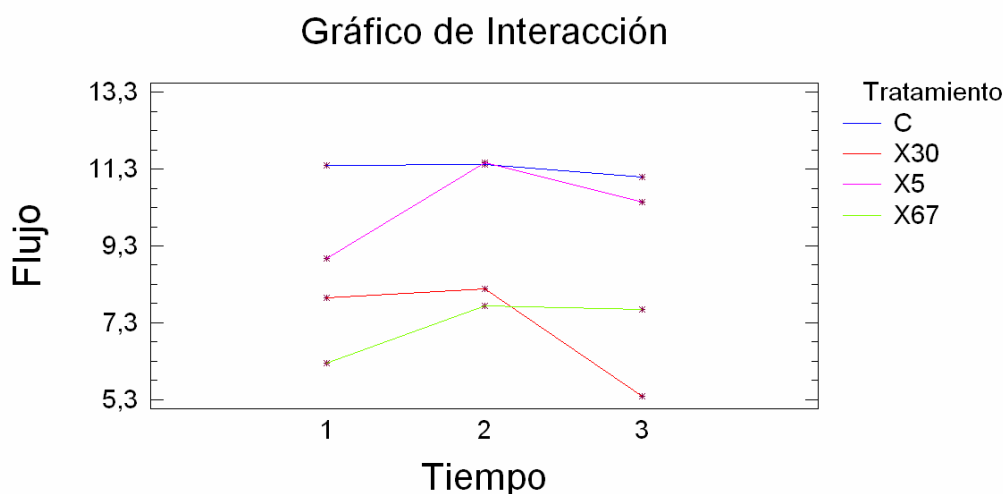


Tabla 6.5. Gráfico de interacción variable dependiente flujo con factores tiempo y tratamiento

En el gráfico podemos observar que en el primer registro los grupos presentan medias de flujo a distintos niveles. Con el transcurso del tratamiento, el nivel de flujo se estabiliza para el grupo control (C) y para el grupo de niños que mastican chicles con xilitol al 67% (X67), que tiene un aumento inicial. Para los otros dos grupos (X5 y X30), se producen descensos de los niveles de flujo, más marcados en el grupo que mastica chicles con xilitol al 30%.

6.2. VARIABLE DEPENDIENTE Ph.

6.2.1 Variable dependiente Ph vs Factores Tiempo y Tratamiento. Medias y 95,0 porcentajes intervalos LSD.

Análisis de la Varianza para pH - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tratamiento	179,988	3	59,996	54,68	0,0000
B:Tiempo	0,33961	2	0,169805	0,15	0,8567
INTERACCIONES					
AB	35,4826	6	5,91377	5,39	0,0000
RESIDUOS	464,116	423	1,0972		
TOTAL (CORREGIDO)	679,876	434			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Tabla 6.6. Análisis de la varianza para variable Ph.

Como observamos en la tabla superior la tabla ANOVA descompone la variabilidad de Ph en las contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha elegido la suma de cuadrados tipo III (valor por defecto), se ha medido la contribución de cada factor eliminando los efectos del resto de factores. Los p-valores comprueban la importancia estadística de cada factor. Dado que los 3 p-valores son inferiores a 0.05, estos 3 factores tienen efecto estadísticamente significativo en Ph para un 95% de confianza.

A continuación se presentan las gráficas de medias de la variable Ph, al analizarse los factores tratamiento y tiempo respectivamente:

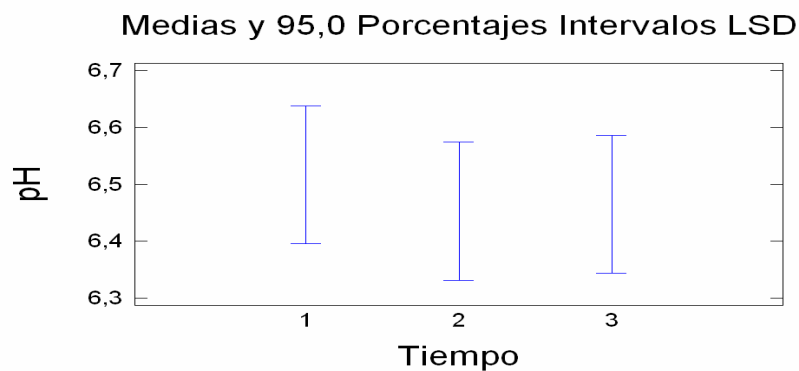


Tabla 6.7. Gráfico de medias de la variable Ph para el factor tiempo

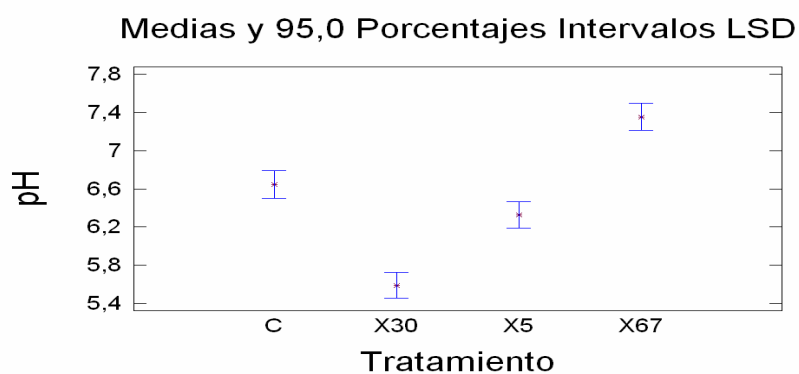


Tabla 6.8. Gráfico de medias de la variable Ph para el factor tratamiento

**6.2.2 Variable dependiente Ph Vs Factores Tratamiento y Tiempo.
Gráfico de interacción.**

Tabla de Medias por mínimos cuadrados para pH
con 95,0 Intervalos de confianza

Nivel	Frecuencia	Media	Error Estándar	Límite Inferior	Límite Superior	
Media Total	435	6,4781				
Tratamiento						
C	99	6,64646	0,105275	6,43954	6,85339	
X30	117	5,58974	0,0968389	5,3994	5,78009	
X5	111	6,32432	0,0994218	6,1289	6,51975	
X67	108	7,35185	0,100793	7,15373	7,54997	
Tiempo						
1	145	6,51709	0,087147	6,3458	6,68839	
2	145	6,45269	0,087147	6,2814	6,62399	
3	145	6,4645	0,087147	6,29321	6,6358	
Tratamiento según Tiempo						
C	1	33	6,57576	0,182342	6,21735	6,93417
C	2	33	6,63636	0,182342	6,27795	6,99477
C	3	33	6,72727	0,182342	6,36886	7,08568
X30	1	39	5,35897	0,16773	5,02929	5,68866
X30	2	39	5,38462	0,16773	5,05493	5,7143
X30	3	39	6,02564	0,16773	5,69595	6,35533
X5	1	37	6,18919	0,172204	5,85071	6,52767
X5	2	37	6,56757	0,172204	6,22909	6,90605
X5	3	37	6,21622	0,172204	5,87773	6,5547
X67	1	36	7,94444	0,174579	7,60129	8,2876
X67	2	36	7,22222	0,174579	6,87907	7,56537
X67	3	36	6,88889	0,174579	6,54574	7,23204

Tabla 6.9. Interacción variable dependiente Ph con factores tiempo y tratamiento

Esta tabla muestra la media de Ph para cada nivel de factores. También presenta el error estándar de cada media, lo cual es una medida de su variabilidad en la muestra. Las dos columnas de la derecha muestran 95,0% intervalos de confianza para cada una de las medias, como se observa en el siguiente gráfico:

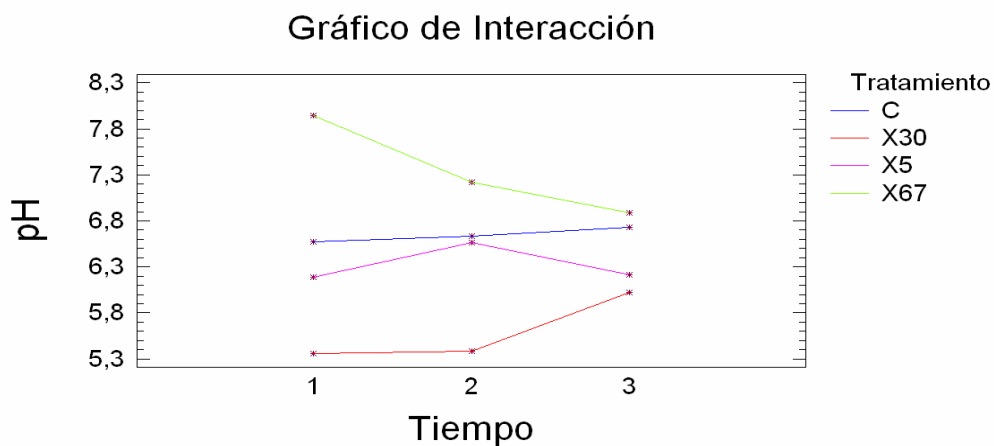


Tabla 6.10. Gráfico de interacción variable dependiente Ph con factores tiempo y tratamiento

En el gráfico se observan niveles de Ph muy variables para todos los grupos en el primer registro. Los grupos de niños que mastican chicles edulcorados con xilitol al 67% (X67) sufren una bajada de Ph, a diferencia del grupo de niños que mastica chicles con xilitol al 30% (X30) que presentan una subida. Los niños participantes en el grupo control y aquellos que mastican chicles con xilitol al 5% (X5) mantienen prácticamente sus niveles de Ph. Si podemos afirmar, que existen en todos los grupos una tendencia a estabilizar estos niveles.

6.3 VARIABLE DEPENDIENTE SM

6.3.1 Variable dependiente *Streptococcus mutans* vs Factores Tiempo y tratamiento. Medias y 95,0 porcentajes intervalos LSD.

Análisis de la Varianza para Sm - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tratamiento	12,2556	3	4,08518	10,11	0,0000
B:Tiempo	52,1307	2	26,0654	64,49	0,0000
INTERACCIONES					
AB	11,1631	6	1,86051	4,60	0,0002
RESIDUOS	170,968	423	0,404179		
TOTAL (CORREGIDO)	248,584	434			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Tabla 6.11. Análisis de la varianza para variable *Streptococcus mutans*.

Como observamos en la tabla superior la tabla ANOVA descompone la variabilidad de *Streptococcus mutans* en las contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha elegido la suma de cuadrados tipo III (valor por defecto), se ha medido la contribución de cada factor eliminando los efectos del resto de factores. Los p-valores comprueban la importancia estadística de cada factor. Dado que los 3 p-valores son inferiores a 0.05, estos 3 factores tienen efecto estadísticamente significativo en flujo para un 95% de confianza.

A continuación se presentan las gráficas de medias de la variable *Streptococcus mutans*, al analizarse los factores tratamiento y tiempo respectivamente:

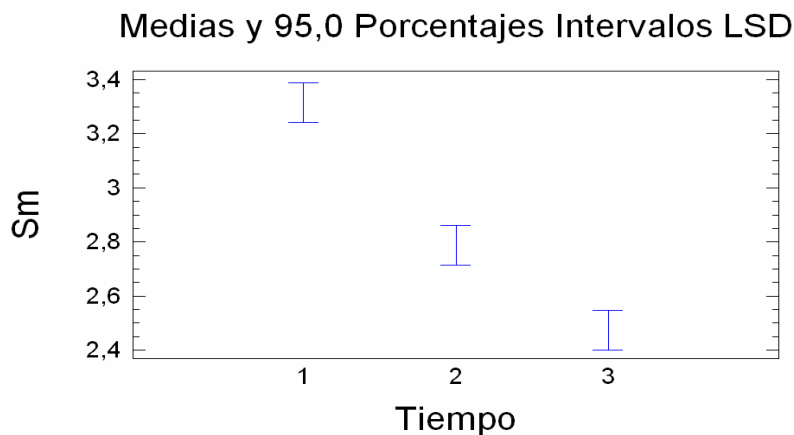


Tabla 6.12. Gráfico de medias de la variable *Streptococcus mutans* para el factor tiempo

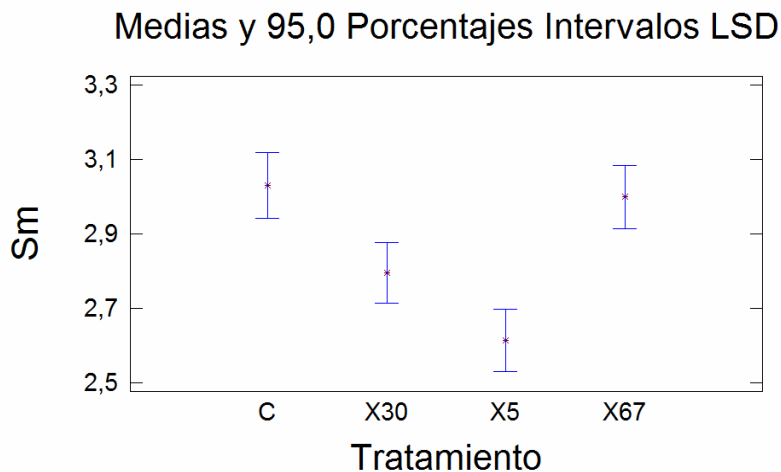


Tabla 6.13 Gráfico de medias de la variable *Streptococcus mutans* para el factor tratamiento

6.3.3 Variable dependiente *Streptococcus mutans* vs Factores Tiempo y Tratamiento. Gráfico de interacción.

Tabla de Medias por mínimos cuadrados para Sm
con 95,0 Intervalos de confianza

Nivel	Frecuencia	Media	Error Estándar	Límite Inferior	Límite Superior	
Media Total	435	2,85945				
Tratamiento						
C	99	3,0303	0,0638953	2,90471	3,1559	
X30	117	2,79487	0,0587752	2,67934	2,9104	
X5	111	2,61261	0,0603428	2,494	2,73122	
X67	108	3,0	0,0611751	2,87975	3,12025	
Tiempo						
1	145	3,31502	0,0528928	3,21106	3,41899	
2	145	2,789	0,0528928	2,68504	2,89297	
3	145	2,47431	0,0528928	2,37035	2,57828	
Tratamiento según Tiempo						
C	1	33	3,36364	0,11067	3,1461	3,58117
C	2	33	2,93939	0,11067	2,72186	3,15693
C	3	33	2,78788	0,11067	2,57035	3,00541
X30	1	39	3,51282	0,101802	3,31272	3,71292
X30	2	39	2,58974	0,101802	2,38964	2,78984
X30	3	39	2,28205	0,101802	2,08195	2,48215
X5	1	37	3,18919	0,104517	2,98375	3,39463
X5	2	37	2,43243	0,104517	2,227	2,63787
X5	3	37	2,21622	0,104517	2,01078	2,42165
X67	1	36	3,19444	0,105958	2,98617	3,40272
X67	2	36	3,19444	0,105958	2,98617	3,40272
X67	3	36	2,61111	0,105958	2,40284	2,81938

Tabla 6.14. Interacción variable dependiente *Streptococcus mutans* con factores tiempo y tratamiento

Esta tabla muestra la media de Sm para cada nivel de factores. También presenta el error estándar de cada media, lo cual es una medida de su variabilidad en la muestra. Las dos columnas de la derecha muestran 95,0% intervalos de confianza para cada una de las medias, como se observa en el siguiente gráfico:

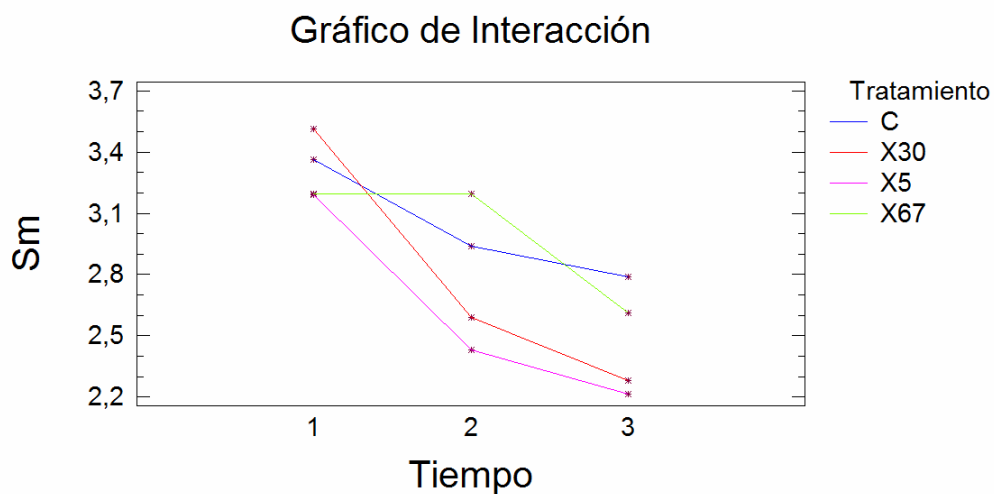


Tabla 6.15. Gráfico de interacción variable dependiente *Streptococcus mutans* con factores tiempo y tratamiento

Al analizar el gráfico podemos observar una clara tendencia a la disminución de los niveles de *Streptococcus mutans* a lo largo del tiempo para todos los grupos, aunque la mayor reducción se observa en los grupos de niños que mastican menor proporción de xilitol (X5, X30) y la menor reducción en el grupo control. Cabe tener presente que los niveles de SM inicialmente eran solo similares para X67 y X5.

6.9 ANÁLISIS VARIABLE SM vs EDAD/ SEXO

Como al realizar el estudio estadístico necesitábamos que todas las muestra tuvieran el mismo tamaño procedimos a eliminar sujetos para igualar el tamaño muestral a 33 (tratamiento C). Al realizar esta elección no se tuvo en cuenta la edad de los individuos objeto de este estudio ni el sexo. Dentro de cada grupo al que se le tenía que aplicar un tratamiento había sujetos de dos edades distintas, 6 y 9 años por un lado y 10 y 12 años por otra. Al seleccionar elementos para eliminarlos se dio la circunstancia que todos los sujetos eliminados pertenecían a un mismo grupo de edad. Para intentar ver si este hecho nos podía haber condicionado los resultados obtenidos hemos procedido a la realización de nuevas tablas en las que estableceremos si hay diferencias significativas en los niveles de Streptococcus mutans para cada tratamiento dependiendo del sexo o la edad de los sujetos sobre los que se ha realizado el estudio.

En todas las comparaciones posteriores las hipótesis que plantearemos serán:

Factor A

H0: No hay diferencias entre edades para los niveles de Sm

H1: Hay diferencias entre edades para los niveles de Sm

o bien

H0: No hay diferencias entre sexos para los niveles de Sm

H1: Hay diferencias entre sexos para los niveles de Sm

Factor B

H0: No hay diferencias a lo largo del tiempo para los niveles de Sm

H1: Hay diferencias a lo largo del tiempo para los niveles de Sm

Interacción AB

H0: No hay interacción entre los diferentes niveles de los dos factores

H1: Hay interacción entre llos diferentes niveles de los dos factores.

Para hacer el estudio hemos comparado las variables edad y tiempo por una parte y sexo y tiempo por otro. En cada caso las variables dependientes serán los diferentes niveles de xilitol C, X5, X30 y X67 aplicados a los diferentes grupos de sujetos.

FACTOR A: Edad

FACTOR B: Tiempo

VARIABLE DEPENDIENTE: Streptococcus mutans (chicle C)

Niveles factor A: 10 años, 12 años

Niveles Factor B: Condiciones Basales (t1), 14 días (t2), 28 días (t3)

T= Niveles factor A

I=Niveles factor B

edad					
10 años			12 años		
t1	t2	t3	t1	t2	t3
3	3	3	4	2	2
3	3	3	3	2	3
3	3	2	4	4	3
3	3	3	3	3	3
3	3	3	4	2	2
4	3	3	3	4	3
4	3	1	2	3	3
3	4	3	4	3	3
3	3	3	4	4	3
4	3	4	3	2	3

FACTOR A: Sexo

FACTOR B: Tiempo

VARIABLE DEPENDIENTE: Streptococcus mutans (chicle C)

Niveles Factor B: niños, niñas

Niveles Factor B: Condiciones Basales (t1), 14 días (t2), 28 días (t3)

T= Niveles factor A

I=Niveles factor B

sexo					
niños			niñas		
t1	t2	t3	t1	t2	t3
3	3	3	4	3	3
3	3	3	4	3	1
3	3	2	3	4	3
3	3	3	3	3	3
3	3	3	4	3	4
4	2	2	3	4	3
3	2	3	2	3	3
4	4	3	4	3	3
3	3	3	4	4	3
4	2	2	3	2	3

FACTOR A: Edad

FACTOR B: Tiempo

VARIABLE DEPENDIENTE: Streptococcus mutans (chicle X30)

Niveles factor A: 6 años y 9 años

Niveles Factor B: Condiciones Basales (t1), 14 días (t2), 28 días (t3)

T= Niveles factor A

I= Niveles factor B

edad					
6 años			9 años		
t1	t2	t3	t1	t2	t3
2	2	1	2	2	2
2	3	1	4	3	2
3	3	2	4	3	3
4	3	2	4	3	3
4	2	2	4	3	2
4	2	2	3	2	3
4	2	2	4	4	4
3	3	2	4	3	3
3	2	2	4	3	3
4	3	3	4	2	2
4	2	2	4	3	3
4	2	2	4	3	2
4	3	2	4	3	2
4	2	2	4	3	2
2	3	2	3	2	2
2	3	2	2	2	2
3	2	4	4	2	2
4	3	2	4	2	2

FACTOR A: Sexo

FACTOR B: Tiempo

VARIABLE DEPENDIENTE: Streptococcus mutans (chicle X30)

Niveles factor A: niños y niñas

Niveles Factor B: Condiciones Basales (t1), 14 días (t2), 28 días (t3)

T= Niveles factor A

I= Niveles factor B

sexo					
niños			niñas		
t1	t2	t3	t1	t2	t3
2	2	1	4	3	2
2	3	1	4	2	2
3	3	2	4	2	2
4	2	2	4	3	2
4	2	2	4	2	2
3	3	2	2	3	2
3	2	2	2	3	2
4	2	2	4	3	2
4	2	2	3	3	3
2	2	2	4	3	2
4	3	2	4	3	3
3	2	3	4	3	3
4	4	4	4	2	2
4	3	3	4	3	2
4	3	3	3	2	2
4	3	3	2	2	2
4	3	2	4	2	2
4	3	2	4	2	2

FACTOR A: Edad

FACTOR B: Tiempo

VARIABLE DEPENDIENTE: Streptococcus mutans (chicle X5)

Niveles factor A: 6 años y 9 años

Niveles Factor B: Condiciones Basales (t1), 14 días (t2), 28 días (t3)

T= Niveles factor A

I=Niveles factor B

edad					
6 años			9 años		
t1	t2	t3	t1	t2	t3
3	3	3	4	3	3
3	2	2	4	2	2
3	3	2	4	2	2
3	2	3	2	2	2
3	3	3	3	2	2
4	2	2	4	2	3
3	3	2	3	2	3
4	2	3	3	3	3
2	2	1	4	2	2
3	2	2	3	2	2
2	2	2	3	3	2
2	2	2	4	3	2
3	3	2	4	3	3
2	3	2	4	2	3

FACTOR A: Sexo

FACTOR B: Tiempo

VARIABLE DEPENDIENTE: Streptococcus mutans (chicle X5)

Niveles factor A: niños y niñas

Niveles Factor B: Condiciones Basales (t1), 14 días (t2), 28 días (t3)

T= Niveles factor A

I=Niveles factor B

sexo					
niños			niñas		
t1	t2	t3	t1	t2	t3
3	3	2	2	2	1
3	2	3	2	2	2
3	3	3	3	3	1
4	2	2	3	3	1
3	3	2	4	3	2
3	2	2	4	2	2
4	3	2	2	2	2
4	3	3	3	3	3
4	2	2	4	2	2
4	2	2	3	2	2
2	2	2	3	3	2
3	2	2	4	3	2
4	2	3	4	3	3
3	2	3	4	2	3

FACTOR A: Edad

FACTOR B: Tiempo

VARIABLE DEPENDIENTE: Streptococcus mutans (chicle X67)

Niveles factor A: 10 y 12 años

Niveles Factor B: Condiciones Basales (t1), 14 días (t2), 28 días (t3)

T= Niveles factor A

I=Niveles factor B

edad					
10 años			12 años		
t1	t2	t3	t1	t2	t3
3	3	3	3	3	3
3	4	3	3	4	2
4	4	3	3	3	3
4	4	3	3	3	3
3	2	2	3	4	3
3	3	3	3	4	2
2	4	3	2	2	2
4	2	3	3	3	2
2	3	3	3	2	2
3	2	3	4	3	2
3	4	3	4	3	2
4	3	2	4	3	2
3	4	2	4	4	3
2	4	3	4	2	2
3	3	3	3	3	3
4	4	2	4	4	3
4	4	3	3	2	2

Al haber una proporción de niños superior a la de niñas no contemplamos con estos datos estudiar las posibles diferencias por sexo para este caso ya que la tabla nos hubiera reducida únicamente a 4 niños y 4 niñas.

FACTOR A: Edad

FACTOR B: Tiempo

VARIABLE DEPENDIENTE: Streptococcus mutans (chicle C)

Niveles factor A: 10 años, 12 años

Niveles Factor B: Condiciones Basales (t1), 14 días (t2), 28 días (t3)

T= Niveles factor A

I=Niveles factor B

Observaciones muestrales

	10 años			12 años			
	t1	t2	t3		t1	t2	t3
S1	3	3	3	S11	4	2	2
S2	3	3	3	S12	3	2	3
S3	3	3	2	S13	4	4	3
S4	3	3	3	S14	3	3	3
S5	3	3	3	S15	4	2	2
S6	4	3	3	S16	3	4	3
S7	4	3	1	S17	2	3	3
S8	3	4	3	S18	4	3	3
S9	3	3	3	S19	4	4	3
S10	4	3	4	S20	3	2	3

33 31 28 34 29 28 183 =Y...

Obs. muestrales al cuadrado

	10 años			12 años			
	t1	t2	t3		t1	t2	t3
S1	9	9	9	S11	16	4	4
S2	9	9	9	S12	9	4	9
S3	9	9	4	S13	16	16	9
S4	9	9	9	S14	9	9	9
S5	9	9	9	S15	16	4	4
S6	16	9	9	S16	9	16	9
S7	16	9	1	S17	4	9	9
S8	9	16	9	S18	16	9	9
S9	9	9	9	S19	16	16	9
S10	16	9	16	S20	9	4	9

Σ 111 97 84 120 91 80 583 =ΣΣΣYtij^2

		Edad		
		10 A	12 A	Σ ΣY_{tj}^2
SUJETOS	9	8	17	145
	9	8	17	145
	8	11	19	185
	9	9	18	162
	9	8	17	145
	10	10	20	200
	8	8	16	128
	10	10	20	200
	9	11	20	202
	11	8	19	185
		92	91	183

		TIEMPO			
		CB	14 D	28 D	Σ
EDAD	10 años	33	31	28	92
	12 años	34	29	28	91
	Σ	67	60	56	183

Sumatorios

$$\begin{aligned} \Sigma \Sigma Y_{tj}^2 &= 583 \\ (Y_{...})^2/N &= 558,15 \\ \Sigma (Y_t)^2 &= 16.745 \\ \Sigma (Y_i)^2 &= 11.225 \\ \Sigma \Sigma (Y_{ti})^2 &= 5.615 \\ \Sigma \Sigma (Y_{tj})^2 &= 1.697 \end{aligned}$$

Sumas Cuadráticas

$$\begin{aligned} SC_{total} &= 24,85 \\ SC_{inter} &= 7,52 \\ SCA &= 0,02 \\ SC_{sujetos} &= 7,50 \\ SC_{intra} &= 17,33 \\ SCB &= 3,10 \\ SCAB &= 0,23 \\ SC(B \times \text{sujetos}) &= 14,00 \end{aligned}$$

TABLA ANOVA (Split-plot)

FV	SC	g.l.	MC	F
Inter	7,52	19	0,02	0,04
A	0,02	1		
Suj.	7,50	18		
Intra	17,33	40	0,42	
B	3,10	2	1,55	3,99
AB	0,23	2	0,12	0,30
BxSuj.	14,00	36	0,39	
Total	24,85	59		

	VALORES CRÍTICOS	
FACTOR A	$F_{0,95}(1,18) = 4,41$	p-valor > 0,05
FACTOR B	$F_{0,95}(2,36) = 3,3$	$0,025 < p\text{-valor} < 0,05$
INTERACCIÓN	$F_{0,95}(2,36) = 3,3$	p-valor > 0,05

Factor A

Como $0,04 < 4,41$ podemos afirmar que no hay diferencias entre 10 y 12 años, y por tanto aceptamos la hipótesis nula, es decir los niveles de Streptococcus no varían dependiendo de la edad de los sujetos para C

Factor B

Como $3,99 > 3,3$ rechazamos la hipótesis nula y podemos afirmar que hay diferencias a lo largo del tiempo en los niveles de Sm para C

Interacción

Como $0,30 < 3,3$ aceptamos la hipótesis nula que afirma que no hay interacción entre los distintos niveles de los dos factores.

FACTOR A: Sexo

FACTOR B: Tiempo

VARIABLE DEPENDIENTE: Streptococcus mutans (chicle C)

Niveles Factor B: niños, niñas

Niveles Factor B: Condiciones Basales (t1), 14 días (t2), 28 días (t3)

T= Niveles factor A

I=Niveles factor B

Observaciones muestrales

	niños			niñas			
	t1	t2	t3	t1	t2	t3	
S1	3	3	3	S11	4	3	3
S2	3	3	3	S12	4	3	1
S3	3	3	2	S13	3	4	3
S4	3	3	3	S14	3	3	3
S5	3	3	3	S15	4	3	4
S6	4	2	2	S16	3	4	3
S7	3	2	3	S17	2	3	3
S8	4	4	3	S18	4	3	3
S9	3	3	3	S19	4	4	3
S10	4	2	2	S20	3	2	3

33 28 27 34 32 29 183 =Y...

Obs. muestrales al cuadrado

	niños			niñas			
	t1	t2	t3	t1	t2	t3	
S1	9	9	9	S11	16	9	9
S2	9	9	9	S12	16	9	1
S3	9	9	4	S13	9	16	9
S4	9	9	9	S14	9	9	9
S5	9	9	9	S15	16	9	16
S6	16	4	4	S16	9	16	9
S7	9	4	9	S17	4	9	9
S8	16	16	9	S18	16	9	9
S9	9	9	9	S19	16	16	9
S10	16	4	4	S20	9	4	9

Σ 111 82 75 120 106 89 583 =ΣΣΣYtij^2

		SEXO		
		niños	niñas	Σ
SUJETOS	9	10	19	181
	9	8	17	145
	8	10	18	164
	9	9	18	162
	9	11	20	202
	8	10	18	164
	8	8	16	128
	11	10	21	221
	9	11	20	202
	8	8	16	128
		88	95	183

		TIEMPO			
		CB	14 D	28 D	Σ
SEXO	niños	33	28	27	88
	niñas	34	32	29	95
	Σ	67	60	56	183

Sumatorios

$$\begin{aligned} \Sigma\Sigma\Sigma Y_{tij}^2 &= 583 \\ (Y_{...})^2/N &= 558,15 \\ \Sigma(Y_t)^2 &= 16.769 \\ \Sigma(Y_i)^2 &= 11.225 \\ \Sigma\Sigma(Y_{ti})^2 &= 5.623 \\ \Sigma\Sigma(Y_{tj})^2 &= 1.697 \end{aligned}$$

Sumas Cuadráticas

$$\begin{aligned} SC_{total} &= 24,85 \\ SC_{inter} &= 7,52 \\ SCA &= 0,82 \\ SC_{sujetos} &= 6,70 \\ SC_{intra} &= 17,33 \\ SC_B &= 3,10 \\ SC_{AB} &= 0,23 \\ SC(B \times \text{sujetos}) &= 14,00 \end{aligned}$$

TABLA ANOVA (Split-plot)

FV	SC	g.l.	MC	F
Inter	7,52	19	0,82	2,19
A	0,82	1		
Suj.	6,70	18	0,37	
Intra	17,33	40		
B	3,10	2	1,55	3,99
AB	0,23	2	0,12	0,30
BxSuj.	14,00	36	0,39	
Total	24,85	59		

VALORES CRÍTICOS

FACTOR A	$F_{0,95}(1,18) = 4,41$	$p\text{-valor} > 0,05$
FACTOR B	$F_{0,95}(2,36) = 3,3$	$0,025 < p\text{-valor} < 0,05$
INTERACCIÓN	$F_{0,95}(2,36) = 3,3$	$p\text{-valor} > 0,05$

Factor A

Como $2,19 < 4,41$ podemos afirmar que no hay diferencias entre sexo, y por tanto aceptamos la hipótesis nula, es decir los niveles de Streptococcus no varían dependiendo del sexo de los sujetos para C

Factor B

Como $3,99 > 3,3$ rechazamos la hipótesis nula y podemos afirmar que hay diferencias a lo largo del tiempo en los niveles de Sm para C

Interacción

Como $0,30 < 3,3$ aceptamos la hipótesis nula que afirma que no hay interacción entre los distintos niveles de los dos factores.

FACTOR A:Edad

FACTOR B: Tiempo

VARIABLE DEPENDIENTE: Streptococcus mutans (chicle X30)

Niveles factor A: 6 años y 9 años

Niveles Factor B: Condiciones Basales (t1), 14 días (t2), 28 días (t3)

T= Niveles factor A

I=Niveles factor B

Observaciones muestrales

	6 años				9 años		
	t1	t2	t3		t1	t2	t3
S1	2	2	1	s19	2	2	2
S2	2	3	1	s20	4	3	2
S3	3	3	2	s21	4	3	3
S4	4	3	2	s22	4	3	3
S5	4	2	2	s23	4	3	2
S6	4	2	2	s24	3	2	3
S7	4	2	2	s25	4	4	4
S8	3	3	2	s26	4	3	3
S9	3	2	2	s27	4	3	3
S10	4	3	3	s28	4	2	2
S11	4	2	2	s29	4	3	3
S12	4	2	2	s30	4	3	2
S13	4	3	2	s31	4	3	2
S14	4	2	2	s32	4	3	2
S15	2	3	2	s33	3	2	2
S16	2	3	2	s34	2	2	2
S17	3	2	4	s35	4	2	2
S18	4	3	2	s36	4	2	2
Σ	60	45	37		66	48	44

300 =Y...

Obs. muestrales al cuadrado

	6 años				9 años		
	t1	t2	t3		t1	t2	t3
S1	4	4	1	s19	4	4	4
S2	4	9	1	s20	16	9	4
S3	9	9	4	s21	16	9	9
S4	16	9	4	s22	16	9	9
S5	16	4	4	s23	16	9	4
S6	16	4	4	s24	9	4	9
S7	16	4	4	s25	16	16	16
S8	9	9	4	s26	16	9	9
S9	9	4	4	s27	16	9	9
S10	16	9	9	s28	16	4	4
S11	16	4	4	s29	16	9	9
S12	16	4	4	s30	16	9	4
S13	16	9	4	s31	16	9	4
S14	16	4	4	s32	16	9	4
S15	4	9	4	s33	9	4	4
S16	4	9	4	s34	4	4	4
S17	9	4	16	s35	16	4	4
S18	16	9	4	s36	16	4	4
Σ	212	117	83		250	134	114

910 =ΣΣΣYtij^2

SUJETOS	6 a	9 a	Σ	ΣYtj ²	TIEMPO	Σ	
							CB
	5	6	11	61			
	6	9	15	117			
	8	10	18	164			
	9	10	19	181			
	8	9	17	145			
	8	8	16	128			
	8	12	20	208			
	8	10	18	164			
	7	10	17	149			
	10	8	18	164			
	8	10	18	164			
	8	9	17	145			
	9	9	18	162			
	8	9	17	145			
	7	7	14	98			
	7	6	13	85			
	9	8	17	145			
	9	8	17	145			
Σ	142	158	300	2570			

$= \Sigma \Sigma (Ytj)^2$

Sumatorios

$$\begin{aligned} \Sigma \Sigma \Sigma Ytj^2 &= 910 \\ (Y\dots)^2/N &= 833,33 \\ \Sigma (Yt)^2 &= 45.128 \\ \Sigma (Yi)^2 &= 31.086 \\ \Sigma \Sigma (Yti)^2 &= 15.590 \\ \Sigma \Sigma (Ytj)^2 &= 2.570 \end{aligned}$$

Sumas Cuadráticas

$$\begin{aligned} SC_{total} &= 76,67 \\ SC_{inter} &= 23,33 \\ SCA &= 2,37 \\ SC_{sujetos} &= 20,96 \\ SC_{intra} &= 53,33 \\ SCB &= 30,17 \\ SCAB &= 0,24 \\ SC(Bxsujetos) &= 22,93 \end{aligned}$$

TABLA ANOVA (Split-plot)

FV	SC	g.l.	MC	F
Inter	23,33	35	2,37	3,84
A	2,37	1		
Suj.	20,96	34		
Intra	53,33	72	0,62	44,74
B	30,17	2		
AB	0,24	2		
BxSuj.	22,93	68	0,34	0,36
Total	76,67	107		

VALORES CRÍTICOS

FACTOR A	F _{0,95(1,34)} = 4,1	p-valor > 0,05
FACTOR B	F _{0,95(2,68)} = 3,1	p-valor < 0,005
INTERACCIÓN	F _{0,95(2,68)} = 3,1	p-valor > 0,05

Factor A

Como $3,84 < 4,1$ podemos afirmar que hay no diferencias entre edades para X30 y por tanto aceptamos la hipótesis nula

Factor B

Como $44,74 > 3,1$ rechazamos la hipótesis nula y podemos afirmar que hay diferencias a lo largo del tiempo para los diferentes grupos de sujetos.

Interacción

Como $0,36 < 3,1$ aceptamos la hipótesis nula que afirma que no hay interacción entre los distintos niveles de los dos factores.

FACTOR A: Sexo

FACTOR B: Tiempo

VARIABLE DEPENDIENTE: Streptococcus mutans (chicle X30)

Niveles factor A: niños y niñas

Niveles Factor B: Condiciones Basales (t1), 14 días (t2), 28 días (t3)

T= Niveles factor A

I=Niveles factor B

Observaciones muestrales

	niños			niñas			
	t1	t2	t3	t1	t2	t3	
S1	2	2	1	S19	4	3	2
S2	2	3	1	S20	4	2	2
S3	3	3	2	S21	4	2	2
S4	4	2	2	S22	4	3	2
S5	4	2	2	S23	4	2	2
S6	3	3	2	S24	2	3	2
S7	3	2	2	S25	2	3	2
S8	4	2	2	S26	4	3	2
S9	4	2	2	S27	3	3	3
S10	2	2	2	S28	4	3	2
S11	4	3	2	S29	4	3	3
S12	3	2	3	S30	4	3	3
S13	4	4	4	S31	4	2	2
S14	4	3	3	S32	4	3	2
S15	4	3	3	S33	3	2	2
S16	4	3	3	S34	2	2	2
S17	4	3	2	S35	4	2	2
S18	4	3	2	S36	4	2	2
	62	47	40		64	46	39

298 =Y...

Obs. muestrales al cuadrado

	niños			niñas			
	t1	t2	t3	t1	t2	t3	
S1	4	4	1	S19	16	9	4
S2	4	9	1	S20	16	4	4
S3	9	9	4	S21	16	4	4
S4	16	4	4	S22	16	9	4
S5	16	4	4	S23	16	4	4
S6	9	9	4	S24	4	9	4
S7	9	4	4	S25	4	9	4
S8	16	4	4	S26	16	9	4
S9	16	4	4	S27	9	9	9
S10	4	4	4	S28	16	9	4
S11	16	9	4	S29	16	9	9
S12	9	4	9	S30	16	9	9
S13	16	16	16	S31	16	4	4
S14	16	9	9	S32	16	9	4
S15	16	9	9	S33	9	4	4
S16	16	9	9	S34	4	4	4
S17	16	9	4	S35	16	4	4
S18	16	9	4	S36	16	4	4
Σ	224	129	98		238	122	87

898 = $\Sigma\Sigma\Sigma Y_{tij}^2$

		niños	niñas	Σ	ΣY_{tj}^2					
	5	9	14	106						
	6	8	14	100						
	8	8	16	128						
	8	9	17	145						
	8	8	16	128						
	8	7	15	113						
	7	7	14	98						
	8	9	17	145						
	8	9	17	145						
	6	9	15	117						
	9	10	19	181						
	8	10	18	164						
	12	8	20	208						
	10	9	19	181						
	10	7	17	149						
	10	6	16	136						
	9	8	17	145						
	9	8	17	145						
Σ	149	149	298	2534	$=\Sigma\Sigma(Y_{tj})^2$					

		TIEMPO			Σ
		CB	14 D	28 D	
SEXO	niños	62	47	40	149
	niñas	64	46	39	149
	Σ	126	93	79	298

Sumatorios

$\Sigma\Sigma\Sigma Y_{tj}^2 = 898$
 $(Y_{...})^2/N = 822,26$
 $\Sigma(Y_t)^2 = 44.402$
 $\Sigma(Y_i)^2 = 30.766$
 $\Sigma\Sigma(Y_{ti})^2 = 15.386$
 $\Sigma\Sigma(Y_{tj})^2 = 2.534$

Sumas Cuadráticas

$SC_{total} = 75,74$
 $SC_{inter} = 22,41$
 $SCA = 0,00$
 $SC_{sujetos} = 22,41$
 $SC_{intra} = 53,33$
 $SCB = 32,35$
 $SCAB = 0,17$
 $SC(Bx_{sujetos}) = 20,81$

TABLA ANOVA (Split-plot)

FV	SC	g.l.	MC	F
Inter	22,41	35	0,00	0,00
A	0,00	1		
Suj.	22,41	34	0,66	
Intra	53,33	72		
B	32,35	2	16,18	52,85
AB	0,17	2	0,08	0,27
BxSuj.	20,81	68	0,31	
Total	75,74	107		

VALORES CRÍTICOS

FACTOR A	F_{0,95(1,34) = 4,1}	p-valor > 0,05
FACTOR B	F_{0,95(2,68) = 3,1}	p-valor < 0,005
INTERACCIÓN	F_{0,95(2,68) = 3,1}	p-valor > 0,05

Factor A

Como $0 < 4,1$ podemos afirmar que hay no diferencias entre sexos para X30 y por tanto aceptamos la hipótesis nula.

Factor B

Como $52,85 > 3,1$ rechazamos la hipótesis nula y podemos afirmar que hay diferencias a lo largo del tiempo para los diferentes grupos de sujetos.

Interacción

Como $0,27 < 3,1$ aceptamos la hipótesis nula que afirma que no hay interacción entre los distintos niveles de los dos factores.

FACTOR A: EDAD

FACTOR B: Tiempo

VARIABLE DEPENDIENTE: Streptococcus mutans (chicle X5)

Niveles factor A: 6 años y 9 años

Niveles Factor B: Condiciones Basales (t1), 14 días (t2), 28 días (t3)

T= Niveles factor A

I=Niveles factor B

Observaciones muestrales

	6 años				9 años		
	t1	t2	t3		t1	t2	t3
S1	3	3	3	S15	4	3	3
S2	3	2	2	S16	4	2	2
S3	3	3	2	S17	4	2	2
S4	3	2	3	S18	2	2	2
S5	3	3	3	S19	3	2	2
S6	4	2	2	S20	4	2	3
S7	3	3	2	S21	3	2	3
S8	4	2	3	S22	3	3	3
S9	2	2	1	S23	4	2	2
S10	3	2	2	S24	3	2	2
S11	2	2	2	S25	3	3	2
S12	2	2	2	S26	4	3	2
S13	3	3	2	S27	4	3	3
S14	2	3	2	S28	4	2	3

40 34 31 49 33 34 221 =Y...

Obs. muestrales al cuadrado

	6 años				9 años		
	t1	t2	t3		t1	t2	t3
S1	9	9	9	S15	16	9	9
S2	9	4	4	S16	16	4	4
S3	9	9	4	S17	16	4	4
S4	9	4	9	S18	4	4	4
S5	9	9	9	S19	9	4	4
S6	16	4	4	S20	16	4	9
S7	9	9	4	S21	9	4	9
S8	16	4	9	S22	9	9	9
S9	4	4	1	S23	16	4	4
S10	9	4	4	S24	9	4	4
S11	4	4	4	S25	9	9	4
S12	4	4	4	S26	16	9	4
S13	9	9	4	S27	16	9	9
S14	4	9	4	S28	16	4	9

Σ 120 86 73 177 81 86 623 =ΣΣΣYtij^2

		Edad		Σ	ΣY_{tj}^2
		6 a	9 a		
SUJETOS	9	10	0	181	
	7	8	15	113	
	8	8	16	128	
	8	6	14	100	
	9	7	16	130	
	8	9	17	145	
	8	8	16	128	
	9	9	18	162	
	5	8	13	89	
	7	7	14	98	
	6	8	14	100	
	6	9	15	117	
	8	10	18	164	
	7	9	16	130	
	Σ	105	116	221	1785 = $\Sigma \Sigma (Y_{tj})^2$

		TIEMPO			Σ
		CB	14 D	28 D	
EDAD	6 años	40	34	31	105
	9 años	49	33	34	116
	Σ	89	67	65	221

Sumatorios

$$\begin{aligned} \Sigma \Sigma Y_{tj}^2 &= 623 \\ (Y_{...})^2 / N &= 581,44 \\ \Sigma (Y_t)^2 &= 24,481 \\ \Sigma (Y_i)^2 &= 16,635 \\ \Sigma \Sigma (Y_{ti})^2 &= 8,363 \\ \Sigma \Sigma (Y_{tj})^2 &= 1,785 \end{aligned}$$

Sumas Cuadráticas

$$\begin{aligned} SC_{total} &= 41,56 \\ SC_{inter} &= 13,56 \\ SCA &= 1,44 \\ SC_{sujetos} &= 12,12 \\ SC_{intra} &= 28,00 \\ SCB &= 12,67 \\ SCAB &= 1,81 \\ SC(B \times sujetos) &= 13,52 \end{aligned}$$

TABLA ANOVA (Split-plot)

FV	SC	g.l.	MC	F
Inter	13,56	27	1,44	3,09
A	1,44	1		
Suj.	12,12	26	0,47	
Intra	28,00	56		
B	12,67	2	6,33	24,35
AB	1,81	2	0,90	3,48
BxSuj.	13,52	52	0,26	
Total	41,56	83		

VALORES CRÍTICOS

FACTOR A	$F_{0,95}(1,26) = 4,23$	$p\text{-valor} > 0,05$
FACTOR B	$F_{0,95}(2,52) = 3,1$	$p\text{-valor} < 0,005$
INTERACCIÓN	$F_{0,95}(2,52) = 3,1$	$0,025 < p\text{-valor} < 0,05$

Factor A

Como $3,09 < 4,23$ podemos afirmar que hay no diferencias entre edades para X5 y por tanto aceptamos la hipótesis nula.

Factor B

Como $24,35 > 3,1$ rechazamos la hipótesis nula y podemos afirmar que hay diferencias a lo largo del tiempo para los diferentes grupos de sujetos sometidos al tratamiento X5

Interacción

Como $3,48 > 3,1$ aceptamos la hipótesis alternativa que afirma que hay interacción entre los distintos niveles de los dos factores.

FACTOR A: Sexo

FACTOR B: Tiempo

VARIABLE DEPENDIENTE: Streptococcus mutans (chicle X5)

Niveles factor A: niños y niñas

Niveles Factor B: Condiciones Basales (t1), 14 días (t2), 28 días (t3)

T= Niveles factor A

I=Niveles factor B

Observaciones muestrales

	niños			niñas			
	t1	t2	t3	t1	t2	t3	
S1	3	3	2	S15	2	2	1
S2	3	2	3	S16	2	2	2
S3	3	3	3	S17	3	3	1
S4	4	2	2	S18	3	3	1
S5	3	3	2	S19	4	3	2
S6	3	2	2	S20	4	2	2
S7	4	3	2	S21	2	2	2
S8	4	3	3	S22	3	3	3
S9	4	2	2	S23	4	2	2
S10	4	2	2	S24	3	2	2
S11	2	2	2	S25	3	3	2
S12	3	2	2	S26	4	3	2
S13	4	2	3	S27	4	3	3
S14	3	2	3	S28	4	2	3

47 33 33 45 35 28 221 =Y...

Obs. muestrales al cuadrado

	niños			niñas			
	t1	t2	t3	t1	t2	t3	
S1	9	9	4	S15	4	4	1
S2	9	4	9	S16	4	4	4
S3	9	9	9	S17	9	9	1
S4	16	4	4	S18	9	9	1
S5	9	9	4	S19	16	9	4
S6	9	4	4	S20	16	4	4
S7	16	9	4	S21	4	4	4
S8	16	9	9	S22	9	9	9
S9	16	4	4	S23	16	4	4
S10	16	4	4	S24	9	4	4
S11	4	4	4	S25	9	9	4
S12	9	4	4	S26	16	9	4
S13	16	4	9	S27	16	9	9
S14	9	4	9	S28	16	4	9

Σ 163 81 81 153 91 62 631 =ΣΣΣYtij^2

		Sexo		
		niños	niñas	Σ ΣY_{tj}^2
SUJETOS	8	5	13	89
	8	6	14	100
	9	7	16	130
	8	7	15	113
	8	9	17	145
	7	8	15	113
	9	6	15	117
	10	9	19	181
	8	8	16	128
	8	7	15	113
	6	8	14	100
	7	9	16	130
	9	10	19	181
	8	9	17	145
	Σ	113	108	221

$= \Sigma \Sigma (Y_{tj})^2$

		TIEMPO			
		CB	14 D	28 D	Σ
SEXO	niños	47	33	33	113
	niñas	45	35	28	108
	Σ	92	68	61	221

Sumatorios

$\Sigma \Sigma Y_{tij}^2 = 631$
 $(Y_{...})^2 / N = 581,44$
 $\Sigma (Y_t)^2 = 24,433$
 $\Sigma (Y_i)^2 = 16,809$
 $\Sigma \Sigma (Y_{ti})^2 = 8,421$
 $\Sigma \Sigma (Y_{tj})^2 = 1,785$

Sumas Cuadráticas

$SC_{total} = 49,56$
 $SC_{inter} = 13,56$
 $SCA = 0,30$
 $SC_{sujetos} = 13,26$
 $SC_{intra} = 36,00$
 $SCB = 18,88$
 $SCAB = 0,88$
 $SC(B \times \text{sujetos}) = 16,24$

TABLA ANOVA (Split-plot)

FV	SC	g.l.	MC	F
Inter	13,56	27	0,30	0,58
A	0,30	1		
Suj.	13,26	26		
Intra	36,00	56	0,51	
B	18,88	2	9,44	30,23
AB	0,88	2	0,44	1,41
BxSuj.	16,24	52	0,31	
Total	49,56	83		

VALORES CRÍTICOS

FACTOR A	$F_{0,95}(1,26) = 4,23$	p-valor > 0,05
FACTOR B	$F_{0,95}(2,52) = 3,1$	p-valor < 0,005
INTERACCIÓN	$F_{0,95}(2,52) = 3,1$	p-valor > 0,05

Factor A

Como $0,58 < 4,23$ podemos afirmar que hay no diferencias entre edades para X5 y por tanto aceptamos la hipótesis nula.

Factor B

Como $30,23 > 3,1$ rechazamos la hipótesis nula y podemos afirmar que hay diferencias a lo largo del tiempo para los diferentes grupos de sujetos sometidos al tratamiento X5

Interacción

Como $1,41 < 3,1$ aceptamos la hipótesis nula que afirma que no hay interacción entre los distintos niveles de los dos factores.

FACTOR A: Edad

FACTOR B: Tiempo

VARIABLE DEPENDIENTE: Streptococcus mutans (chicle X67)

Niveles factor A: 10 y 12 años

Niveles Factor B: Condiciones Basales (t1), 14 días (t2), 28 días (t3)

T= Niveles factor A

I=Niveles factor B

Observaciones muestrales

	10 años			12 años			
	t1	t2	t3	t1	t2	t3	
S1	3	3	3	S18	3	3	3
S2	3	4	3	S19	3	4	2
S3	4	4	3	S20	3	3	3
S4	4	4	3	S21	3	3	3
S5	3	2	2	S22	3	4	3
S6	3	3	3	S23	3	4	2
S7	2	4	3	S24	2	2	2
S8	4	2	3	S25	3	3	2
S9	2	3	3	S26	3	2	2
S10	3	2	3	S27	4	3	2
S11	3	4	3	S28	4	3	2
S12	4	3	2	S29	4	3	2
S13	3	4	2	S30	4	4	3
S14	2	4	3	S31	4	2	2
S15	3	3	3	S32	3	3	3
S16	4	4	2	S33	4	4	3
S17	4	4	3	S34	3	2	2
	54	57	47		56	52	41

307 =Y...

Obs. muestrales al cuadrado

	10 años			12 años			
	t1	t2	t3	t1	t2	t3	
S1	9	9	9	S18	9	9	9
S2	9	16	9	S19	9	16	4
S3	16	16	9	S20	9	9	9
S4	16	16	9	S21	9	9	9
S5	9	4	4	S22	9	16	9
S6	9	9	9	S23	9	16	4
S7	4	16	9	S24	4	4	4
S8	16	4	9	S25	9	9	4
S9	4	9	9	S26	9	4	4
S10	9	4	9	S27	16	9	4
S11	9	16	9	S28	16	9	4
S12	16	9	4	S29	16	9	4
S13	9	16	4	S30	16	16	9
S14	4	16	9	S31	16	4	4
S15	9	9	9	S32	9	9	9
S16	16	16	4	S33	16	16	9
S17	16	16	9	S34	9	4	4
Σ	180	201	133		190	168	103

975 = $\Sigma\Sigma\Sigma Y_{tij}^2$

		Edad			
		10 a	12 a	Σ	ΣY_{tj}^2
SUJETOS	9	9	9	18	162
	10	9	9	19	181
	11	9	9	20	202
	11	9	9	20	202
	7	10	9	17	149
	9	9	9	18	162
	9	6	9	15	117
	9	8	9	17	145
	8	7	9	15	113
	8	9	9	17	145
	10	9	9	19	181
	9	9	9	18	162
	9	11	9	20	202
	9	9	9	17	145
	9	9	9	18	162
	10	11	9	21	221
	11	7	9	18	170
Σ	158	149	307	2821	$=\Sigma\Sigma(Y_{tj})^2$

		TIEMPO			
		CB	14 D	28 D	Σ
EDAD	10 años	54	57	47	158
	12 años	56	52	41	149
	Σ	110	109	88	307

Sumatorios

$\Sigma\Sigma\Sigma Y_{tj}^2 = 975$
 $(Y_{...})^2/N = ####$
 $\Sigma(Y_t)^2 = ####$
 $\Sigma(Y_i)^2 = ####$
 $\Sigma\Sigma(Y_{tj})^2 = ####$
 $\Sigma\Sigma(Y_{tj})^2 = 2.821$

Sumas Cuadráticas

$SC_{total} = 50,99$
 $SC_{inter} = 16,32$
 $SCA = 0,79$
 $SC_{sujetos} = 15,53$
 $SC_{intra} = 34,67$
 $SCB = 9,08$
 $SCAB = 1,12$
 $SC(Bx_{sujetos}) = 24,47$

TABLA ANOVA (Split-plot)

FV	SC	g.l.	MC	F
Inter	16,32	33	0,79	1,64
A	0,79	1		
Suj.	15,53	32	0,49	
Intra	34,67	68		
B	9,08	2	4,54	11,87
AB	1,12	2	0,56	1,46
BxSuj.	24,47	64	0,38	
Total	50,99	101		

VALORES CRÍTICOS

FACTOR A	$F_{0,95}(1,32) = 4,1$	$p\text{-valor} > 0,05$
FACTOR B	$F_{0,95}(2,64) = 3,1$	$p\text{-valor} < 0,005$
INTERACCIÓN	$F_{0,95}(2,64) = 3,1$	$p\text{-valor} > 0,05$

Factor A

Como $1,64 < 4,1$ podemos afirmar que hay no diferencias para las diferentes edades y por tanto aceptamos la hipótesis nula.

Factor B

Como $11,87 > 3,1$ rechazamos la hipótesis nula y podemos afirmar que hay diferencias a lo largo del tiempo para los diferentes grupos de edades con el tratamiento X67

Interacción

Como $1,46 < 3,1$ aceptamos la hipótesis nula que afirma que no hay interacción entre los distintos niveles de los dos factores.

*D*ISCUSIÓN

El desarrollo de chicles que contienen edulcorantes no cariogénicos constituyó una alternativa a la masticación de *chicles con azúcar*. La masticación de estos *chicles sin azúcar*, provocan un aumento del Ph debido a la estimulación del flujo salivar, con el consiguiente resultado de aumento de los niveles de bicarbonato ^{134,151,185,186} que a largo plazo provocan una disminución de los niveles en la incidencia de caries ^{151,158,187-189} ,

Como hemos analizado en el apartado fundamentos, los chicles que contienen en su composición química xilitol, son los que presentan mejores resultados en cuanto a las variables que hemos analizado en este estudio: flujo, Ph y concentración de *Streptococcus mutans* salivares. Distintos autores consideran que la masticación de chicles con xilitol produce un aumento del flujo, Ph y disminución de *Streptococcus mutans* en saliva; y justifican estos efectos por las propiedades químicas de esta molécula. Sin embargo otros autores consideran que el hecho de la masticación es fundamental, y dichos efectos se producen más por el hecho de masticar que por la propia composición química del xilitol ^{89,144,166,190,191} ,

En un estudio previo, comprobamos como el efecto de la masticación resultó fundamental en la estimulación de flujo y recuperación de pH. Al analizar la variable *Streptococcus mutans* no observamos reducciones de estas poblaciones bacterianas, ya que la investigación realizada, de tipo transversal in vivo, de 1 día de duración, no podía demostrar la reducción de microorganismos, ya que esta reducción se produce tras 14 días de masticación, como mínimo ¹⁹² .

A continuación analizaremos detalladamente cada una de las variables en relación a los factores tratamiento y tiempo, respectivamente.

En cuanto a la variable *flujo salivar* se observaron diferencias estadísticamente significativas de la misma en relación con los factores tratamiento y tiempo, como se detalló en la sección resultados. De igual manera podemos afirmar que existe interacción de los dos factores para la misma variable, ya que el comportamiento de cada tratamiento es diferente a lo largo del tiempo. Observamos como los grupos que mastican xilitol al 5% y xilitol al 67% son los grupos que presentan mayores aumentos de flujo durante los primeros 14 días de tratamiento; manteniéndose estos niveles para el grupo X67 y disminuyendo para X5 durante el segundo periodo. El grupo que mastica chicles con xilitol al 30% tras un ligero aumento inicial presenta disminuciones de flujo y esta variable se mantiene constante en el grupo control. Conviene tener presente que las condiciones iniciales de los valores flujo para cada grupo ya eran distintas desde el primer registro, por lo que no podemos esperar una misma evolución al aplicar diferentes tipos de tratamiento. Un factor que especulamos que ha podido influir, puede observarse en las tablas de recogida de datos que aparecen en el anexo donde en líneas generales observamos la gran variabilidad de valores dentro de los distintos grupos.

En líneas generales, para todos los grupos, se produce un aumento de flujo desde condiciones basales hasta el segundo registro y una disminución de flujo en el tercer registro. Al analizar este aspecto debemos tener presente la motivación inicial de los niños. Cuando se inició la investigación, los niños estaban muy motivados por participar, al tratarse de una actividad nueva que desconocían y al mismo tiempo, les restringía un poco de tiempo de su periodo lectivo. Esta motivación inicial, fue perdiendo fuerza, a lo largo del ensayo, apreciando su cansancio al realizar el tercer registro, coincidiendo con el último día del calendario escolar, sobre todo en los grupos X5 y X30, que presentaban menor edad.

Es importante considerar que al estudiar la variable flujo salivar, fue necesario recoger muestras de saliva estimulada, más difícil de registrar que muestras de saliva no estimulada ¹⁹³⁻¹⁹⁷ . Para analizar la capacidad de secreción salivar, se realizó una prueba piloto previa donde se les hacía masticar parafina y escupir, para que los niños aprendieran el procedimiento antes de realizar los registros. Comprobando, que el sabor de la parafina les resultaba desagradable y se veía dificultado la masticación y con ello la recogida de la muestra, decidimos utilizar el mismo chicle, según el grupo al que participan, para llevar a cabo la estimulación del flujo salivar.

Otro factor a considerar es la estructura del chicle. Los niños participantes en los grupos X5 y X30 masticaron un chicle con estructura chicle-caramelo, de mayor dureza que los chicles empleados en los grupos X67 y el grupo control, donde se ve dificultada la masticación y por tanto podemos especular que se reduce el flujo salivar, asociado a esta menor dureza. Este aspecto puede relacionarse también con el factor edad, ya que precisamente los niños que masticaban chicle-caramelo, de menor edad, aunque presentan menos fuerza masticatoria, presentan un mayor aumento de flujo inicialmente que desciende desde el segundo al tercer registro por la falta de motivación. El grupo X67, compuesto por niños de mayor edad, mastican chicles de menor dureza, pero durante los tres registros presentaron igual motivación a la hora de recoger muestras de flujo salivar. Hildebrant ¹⁴⁰ considera que uno de los principales factores que influye en la estimulación salivar es la fuerza de masticación; de este modo las distintas fuerzas de masticación asociadas con la edad pueden haber influido en la recogida de nuestros flujos salivares.

Son varios los estudios como el de Masalin que consideran que la masticación de chicles con xilitol producen grandes aumentos de flujo salivar; remarcando la importancia de este polialcohol en la prevención de la caries dental por el aumento de saliva estimulada ¹⁹⁸. De igual manera, Bin Peng, refiere que entre los efectos más destacables del uso de chicles sin azúcar es la capacidad de aumento del flujo salivar, destacando que los chicles de xilitol reducen los índices de caries de manera significativa, por el efecto potencial de aumento de flujo ⁶².

Sin embargo otros autores no coinciden con los resultados obtenidos en nuestro estudio, donde se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Machiulskiene y cols confirman que el hecho de la masticación es fundamental en el aumento del flujo salivar, que llevará a prevenir el desarrollo de la caries dental, independientemente del edulcorante que lleven incorporados los chicles¹⁶⁷. Koparal, al comparar el efecto de la estimulación salivar y la consiguiente recuperación del pH tras la masticación de chicles con xilitol o gomas naturales (*Pistacia lenticus*), observa que ambos parámetros aumentan en mayor proporción en el grupo de niños que masticaron los chicles naturales ¹⁵.

Otros autores no encuentran diferencias estadísticamente significativas en la masticación de chicles edulcorados con xilitol y aquellos que no presentan este polirol en su composición química. Aguirre-Zero y cols estudiaron el efecto de la masticación de chicles con xilitol, sorbitol, sacarosa y la no masticación de chicle, en distintos grupos, concluyendo que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a aumento del flujo salivar en cada uno de los grupos de estudio, considerando que el efecto de la masticación es fundamental en el efecto anti-caries de la masticación de chicles ¹⁴⁸. Tanzer, confirma que no existe evidencia total sobre que la masticación de chicles con xilitol aumente el flujo salivar, al no obtener diferencias estadísticamente significativas entre chicles con diferentes edulcorantes ¹⁹⁰.

Tras realizar nuestro estudio, especulamos que el hecho de la masticación es muy importante en el efecto anticaries del consumo de chicles, por el aumento del flujo salivar, aunque el factor que más influye es el componente de los chicles, en este caso el xilitol. La masticación de chicles, edulcorados con xilitol, producen una estimulación del flujo salivar, que provocará un aumento del pH y de la capacidad buffer y facilitará la remineralización, previniendo el desarrollo de la caries dental ^{199,200}. No podemos afirmar que a mayores concentraciones de xilitol el flujo aumente, porque aunque se produzcan aumentos de flujos en los participantes que mastican xilitol al 5 y 67%, también se producen disminuciones en el grupo de participantes que mastican xilitol al 30%. Esta reducciones durante el segundo periodo están justificadas sobre todo por los posibles factores de error que hayan podido influir en la recogida de la muestra, destacando sobre todo el factor motivación, que se encontró disminuido en los niños de menor edad y que masticaron chicles con xilitol al 5% y 30%.

En cuanto a la **variable Ph**, se observaron diferencias estadísticamente significativas de la misma en relación al factor tratamiento; sin embargo no se encontraron diferencias respecto al factor tiempo. De igual manera podemos afirmar que existe interacción de los dos factores para la misma variable. Analizando individualmente cada grupo de estudio, observamos como el grupo que mastica xilitol al 5%, tras un aumento de Ph inicial, mantiene después sus valores de Ph, como sucede en el grupo control. No obstante, el grupo que mastica xilitol al 30% sufre aumentos en los valores de Ph a diferencia de los individuos que consumen xilitol al 67% donde se observan disminuciones de Ph.

Al igual que cuando hemos discutido la variable flujo, señalamos que se observan diferencias en cuanto a los valores de Ph entre distintos individuos de un mismo grupo y grupos distintos, lo que constituye un factor a tener en cuenta.

En líneas generales, conviene considerar que los chicles que presentan xilitol al 5% y 30% presentan en su composición química ácido cítrico que sitúa las medias de Ph de los niños en niveles más bajos que los obtenidos en los otros dos grupos. Es un factor que debemos tener presente, ya que, aunque a lo largo del tiempo se vayan estabilizando los niveles de Ph, durante nuestros registros, sobre todo el grupo X30 se encuentra en niveles críticos. Observando el progreso de los distintos tratamientos, podríamos especular que si se hiciesen más registros, estas líneas de tratamiento podrían converger más al seguir la tendencia que presentan, unificándose los niveles de Ph.

Son pocos los estudios que estudian el Ph tras la masticación de chicles que contienen xilitol y otros edulcorantes en su composición química. En la bibliografía revisada, muchos autores consideran que el aumento del Ph se debe fundamentalmente al efecto de la masticación. Es importante el considerar como el aumento de flujo provoca un aumento de Ph, al analizar la saliva estimulada **134,151,185,186,201** ,

En nuestro estudio no existe una correlación general de flujo y Ph para todos los grupos de estudio; en comparación con el flujo sólo los grupos que presentan menor proporción de xilitol, el X5 y el grupo control, presentan comportamientos similares con la variable flujo. Podría justificarse diciendo que en este caso el efecto de la masticación es fundamental, sin importar la presencia del xilitol. También podríamos relacionar el aumento de Ph de los grupos que mastican xilitol al 30% y en menor medida xilitol al 5% por el tamaño y estructura de los chicles. Estos dos tipos de chicles, de constitución similar, presentan mayor dureza, y pueden estimular mayormente el flujo y con ello obtener mayores niveles de Ph. Sin embargo, en nuestro estudio esta hipótesis no está bien considerada pues no existe una relación directamente proporcional entre flujo y Ph.

Otros autores consideran que la masticación de chicles que contienen en su composición químicos sustitutos del azúcar, como los polialcoholes, provocan una recuperación del Ph tras la ingesta de hidratos de carbono, obteniéndose diferencias de éxito según el tipo de edulcorante. Grillaud demuestra que la masticación de chicles con xilitol provocan las mayores recuperaciones de Ph ¹³¹. Ramón en una revisión bibliográfica de los efectos de la masticación de chicles con xilitol considera que la recuperación del Ph es mayor en individuos que mastican chicles con este edulcorante no calórico ¹⁶⁵. Estas observaciones se verían sólo en el grupo de estudio X30, que es donde se observan aumentos en los niveles de Ph, aunque estos niveles no fueron comparables con la variable flujo.

Consideramos por tanto, que en nuestro estudio, el hecho de la masticación no influye directamente en la recuperación del pH tras el consumo de chicles. La masticación de pequeñas dosis de xilitol provocan mayores aumentos de Ph; la masticación a dosis elevadas provoca el efecto inverso, mayores reducciones de Ph. Conviene tener presente factores que influyan en esta variable como son: estructura del chicle, presencia de ácidos, Ph propio del chicle, relación con flujo salivar y condicionantes personales del individuo ²⁰¹.

En cuanto a la variable concentración de *Streptococcus mutans*, se observaron diferencias estadísticamente significativas de los grupos en relación a los factores tratamiento y tiempo respectivamente. De igual manera podemos afirmar que existe interacción de los dos factores para la misma variable. Se decidió valorar la posible influencia de los factores edad y sexo en nuestra muestra ya que hay estudios que los consideran y creímos conveniente analizarlos. Podemos afirmar que no existen diferencias entre los distintos tratamientos al analizar el factor sexo; sin embargo se observan diferencias a lo largo del tiempo entre los distintos tratamientos al analizar este mismo factor. Cuando observamos variaciones entre los grupos al analizar el factor edad no se observan diferencias entre ellos, sólo se observan diferencias a lo largo del tiempo, como ocurre cuando se analiza el factor sexo.

En nuestro estudio, se produce una disminución en todos los grupos de las poblaciones bacterianas a lo largo del tiempo, aunque de forma distinta entre los grupos. La mayor reducción se produce para el grupo que mastica xilitol al 5%, que en condiciones basales presentaba los valores más bajos. La reducción óptima se observa en grupo que mastica xilitol al 30%, ya que inicialmente presentaba los niveles más altos de *Streptococcus mutans* y proporcionalmente ha obtenido la mayor reducción. El grupo que mastica los mayores porcentajes de xilitol, al 67%, ha obtenido disminución de bacterias, pero proporcionalmente no presenta una reducción equitativa con respecto a los otros dos grupos de estudio. Para el grupo control se observan reducciones de bacterias, pero no en gran medida como los grupos que mastican chicles que contienen xilitol. En líneas generales, para todos los tratamientos se producen reducciones de los niveles de *Streptococcus mutans* aunque las condiciones basales de este tipo de bacterias no hayan sido similares en todos los grupos, por lo que la evolución del tratamiento es distinta.

Estudios como los realizados por Isokangas, Soderling, Mäkinen y Lif Holgerson y cols han demostrado como la masticación de chicles con xilitol produce una disminución de la concentración de *Streptococcus mutans* en saliva ^{165,168,169}. Así, Mäkinen y cols tras un programa de masticación de 6 meses de duración, en una muestra de niños de 5 años, de chicles edulcorados con xilitol o sorbitol, considera que la disminución en la concentración de *Streptococcus mutans* no se debe al efecto de la masticación en sí. Los mejores resultados en la disminución se producen por el efecto antibacteriano del xilitol ¹⁶⁹. De igual modo, Autio establece que los chicles con xilitol tienen un importante efecto anticaries por la propiedad antibacteriana de este tipo de edulcorante, que permite una mayor reducción del ácido láctico. Pero este efecto antibacteriano para la mayoría de los estudios, se establece siempre que se considere la masticación de chicles edulcorados con xilitol a largo plazo ¹²⁴.

Aunque nuestro estudio, al igual que el desarrollado por Mäkinen y cols compara chicles que contienen xilitol y sorbitol como edulcorantes, conviene destacar que la duración del mismo puede influir en los resultados; y aun considerando ellos que el efecto de la masticación es fundamental en la reducción, no debemos olvidar las propiedades antibacterianas del xilitol. El tiempo de masticación de chicles con xilitol influye en la capacidad antibacteriana de este poliol. En nuestro estudio la máxima reducción de los niveles de *Streptococcus mutans* se produce durante los primeros 14 días, a excepción del grupo X67 que presenta la reducción a partir de los 14 días. Dodds considera que la masticación de chicles con xilitol durante 14 días produce un aumento en la cantidad de flujo salivar y el pH, y reducción de los niveles de *Streptococcus mutans* ¹⁴⁹.

Sin embargo otros autores consideran esta disminución en periodos de tiempos posteriores. Así Soderling y cols no encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a estimulación de flujo salivar, tras la masticación durante un periodo de dos semanas de chicles de xilitol o sorbitol o mixtos ¹²⁷. Autio y Loesche consideran que los resultados de estimulación de flujo que lleva a una disminución de los niveles de *Streptococcus mutans* en saliva en pacientes de alto riesgo, se produce tras la masticación durante cuatro semanas de chicles con xilitol ^{15,124}. Autores como Soderling, aceptan que el consumo de chicles edulcorados con xilitol, a partir de 3 semana de masticación ya producen una reducción en los niveles de *Streptococcus mutans* en saliva, en niños con bajo riesgo de caries ¹²⁴.

Especial atención al considerar de que aunque exista suficiente bibliografía que apoye a que el hecho de la masticación aumenta el flujo salivar, ^{89,144,166,190,191} no está del todo claro que este aumento de flujo sea suficiente para obtener la disminución de estos microorganismos. Es importante tener presente que el aumento de flujo salivar aumenta los elementos antibacterianos de la saliva y por tanto podemos considerar, que chicles que no contienen xilitol en su composición química, sólo por el hecho de la masticación tienen un importante papel antibacteriano, como se ha observado en nuestro estudio donde el grupo control presenta una reducción de los niveles de *Streptococcus mutans*, sin contener xilitol en su composición química.

Estudios como el desarrollado por Askoy¹⁹⁹ demuestran como la masticación de chicles que contienen productos naturales como resinas como la *Pistacia lentiscus*, derivadas de árboles de las zonas del Mediterráneo (Turkía), sin la necesidad de tener incorporados, en su composición química, edulcorantes como xilitol y sorbitol, con propiedad antibacteriana y antimicrobiana, son suficientes en la disminución de la concentración de *Streptococcus mutans* en saliva. En este estudio se comparaba el efecto de la masticación de un chicle placebo (compuesto mayoritariamente por parafina) con el grupo de individuos que masticaba el chicle resinoso. Se observaron importantes reducciones bacterianas en el grupo experimental. Resultados similares se obtienen en el estudio, referido por Askoy y realizado por Takahashi y cols publicado en el 2003, de diseño similar¹⁹⁹. Hildebrant en un estudio que comparó la capacidad antibacteriana conseguida tras la masticación de chicles con xilitol o chicles que combinaban sorbitol, aspartamo y sacarina, no encontró diferencias estadísticamente significativas en esta reducción. Observando que la estimulación salival fue similar para ambos tipos de chicles, concluye que el efecto de la masticación es fundamental en la reducción de esta especie bacteriana tras la masticación de chicles ¹⁴⁰.

Los chicles utilizados en nuestro estudio presentan diferencias en cuanto a su estructura, como se ha explicado al analizar las variables flujo y Ph. Conviene destacar aquí que se realizó un estudio en la Universitat Internacional de Catalunya de tipo longitudinal in vivo que pretendía evaluar el efecto sobre la placa y flora bacteriana tras la ingesta regular de xilitol en comprimidos desleíbles. Los resultados, independientemente de la higiene, mostraban una reducción de la placa bacteriana y el número de *Streptococcus mutans*, relacionado con la toma de comprimidos desleíbles con xilitol. Se puede considerar aquí que el efecto del xilitol influye por sí sólo en la reducción de esta especie bacteriana, independientemente al hecho de la masticación ⁹⁸.

Si observamos en el anexo los datos recogidos para cada grupo, podemos observar que en líneas generales la mayoría de los participantes presentan elevados niveles de *Streptococcus mutans* en condiciones basales. Hildebrant considera que la masticación de chicles con xilitol produce reducciones en las concentraciones de esta bacteria, controlando así el riesgo de caries dental en poblaciones susceptibles ¹⁴⁰. Al analizar este aspecto, consideramos que los tests de detección de bacterias tienen una elevada sensibilidad en la detección de la actividad de caries de determinadas poblaciones, y sobre todo aquellas que tienen alto riesgo de caries, aunque otros factores deben tenerse en cuenta además del recuento bacteriano, tales como hábitos de higiene y dieta, o historia de caries anterior ²⁰².

En la determinación de esta variable se usaron muestras de saliva estimulada, ya que se analizó la variable flujo y necesitábamos estudiar niveles de saliva estimulada, para analizar el efecto de la masticación con chicles. Autores como Olilla, Weinberg y Gabre consideran que en niños es más fácil recoger muestras de saliva no estimulada mediante depresores linguales, tiras de determinación de bacterias o rollitos de algodón, por su difícil capacidad de colaboración ^{63,202-204}.

Dentro del análisis de la capacidad antibacteriana provocada por el xilitol debemos considerar la *capacidad de reducción del depósito de la placa bacteriana* ¹³¹. Esta variable fue analizada por nosotros en un estudio anterior ¹⁹² y aunque en un primer momento se decidió registrar la variable, no se pudo proceder a analizarla por normativas en la legislación del centro donde se realizó el estudio. El análisis de índices de placa, suponía duplicar la pérdida de horas lectivas para los participantes del estudio, situación que no fue aceptada por la Junta Directiva del Centro Escolar.

Sin embargo conviene señalar que la mayoría de los estudios que analizan las posibles modificaciones en cuanto a la capacidad de adhesión de la placa, se basan en considerar el tipo de edulcorante incorporado en los chicles. Los chicles edulcorados con xilitol son los que presentan mejores resultados en cuanto a la reducción de la acumulación de la placa dental ^{131,190,195}. La mayoría de los estudios indican resultados beneficiosos de la masticación de chicles, durante un periodo de 2 y 3 semanas sobre la reducción de acidogenicidad de la placa a la respuesta a la sacarosa y la glucosa ¹⁹¹. Sin embargo, hay estudios como los desarrollados por Soderling, Gazi, Etemadzadeh, Smith, Askoy y Takahashi ²⁰⁵⁻²⁰⁸ que consideran que la reducción de la placa dental no depende del propio xilitol; concluyen que el efecto de la masticación de chicles con diferente tipo de edulcorante resulta eficaces en la reducción de la placa dental.

Consideramos por tanto, que en nuestro estudio, el hecho de la masticación es importante pero no fundamental en la disminución de los niveles de *Streptococcus mutans*, ya que las máximas reducciones se producen en los individuos que mastican chicles edulcorados con xilitol. Señalar que no hay una reducción proporcional con la dosis, por lo que el grupo X67 que mastica mayor proporción de xilitol no presenta mayor reducción de bacterias

Discusión de otras variables de interés relacionadas con las variables independientes.

En cuanto a la bibliografía revisada son poco los estudios que analizan la variable *capacidad buffer* en relación a la masticación de chicles. Por este motivo y por no ser tan relevante esta variable no fue analizada en este estudio. La mayoría de autores consideran que tras la masticación de chicles, se producen grandes capacidades de amortiguación frente al ataque ácido, aumentando los niveles de Ph. Podemos hacer referencia a algunos autores como Burt, que considera que la masticación de cualquier tipo de goma de mascar produce un aumento de la capacidad buffer, debido a la estimulación del flujo salivar que desencadenará en una neutralización del Ph de la placa. Este beneficio anti-caries se basa por el hecho de la masticación, independientemente del edulcorante incorporado que lleve ²⁰⁹. Sin embargo, autores como Ramón, demuestran que si influye, el tipo de edulcorante, y en concreto el xilitol en la mayor recuperación de Ph ¹⁶⁵. Otros autores también consideran factores que influyan en la capacidad buffer. Destacamos a Machiulskiene, determina que la capacidad buffer se puede ver aumentada al aumentar el peso de los chicles, que favorecerá la masticación y por tanto el efecto de amortiguación del Ph ¹⁶⁸.

De la diversidad de estudios realizados sobre el xilitol incorporado a los chicles, nunca se ha afirmado que este edulcorante pudiese causar caries dental. Actualmente consideramos al xilitol, como un edulcorante anti-cariogénico en humanos, como lo explica Tanzer en su revisión bibliográfica ¹⁹⁰. Los efectos en cuanto a la *reducción de la caries dental*, no se pueden ver a corto plazo; por medio de estudios de tipo transversal. Se deben realizar estudios de tipo longitudinal para comprobar este efecto ^{62,144,169,210}. Otra de las propiedades que se puede comprobar mediante estudios longitudinales, en relación a la masticación de chicles con xilitol, es la *capacidad de remineralización* ^{117,165,171}.

Es importante la *incorporación de estrategias de prevención oral a nivel escolar*. A través de estos programas, es posible educar y motivar a los niños, padres y personal escolar para que sean conscientes de la importancia de la higiene oral, aunque sin olvidar el resto de estrategias preventivas ^{16,105,124,,151,158,184}. Son muy exitosas las campañas de prevención llevadas a cabo a nivel de escuelas en donde se incorpora la masticación, sobre todo de chicles de xilitol como una estrategia preventiva dentro de la rutina diaria del cuidado de salud oral ^{16,62,124}. En la zona de los Países Nórdicos y sobre todo en Finlandia ha incrementado su uso debido a varios motivos: la prevención de la caries gracias al xilitol fue demostrada en este país, los chicles de xilitol se producen en Finlandia mayoritariamente, los dentistas fineses recomiendan de forma tajante la masticación de chicles de xilitol para el cuidado diario de la salud oral y entre el 94 y 100% de los educadores en salud dental recomiendan el uso de chicles de xilitol en sus campañas de prevención ¹⁶. Los niños suelen recibir los chicles cuatro o cinco veces al día, durante el periodo escolar, exceptuando los días de vacaciones. Suelen masticar dos chicles por la mañana, uno tras el almuerzo, supervisados por los profesores; y el último en casa, tras la cena, supervisados por los padres ⁶². Es importante recordar en este punto que la masticación de chicles intenta sustituir el cepillado dental a nivel escolar, por falta de personal para supervisar el cepillado, evitando el riesgo de infecciones cruzadas e infraestructuras inadecuadas, aunque se deba controlar la masticación del chicle ^{124,169,210}.

Los programas preventivos basados en la masticación de chicles con xilitol se llevan a cabo en países con pocos recursos, como los proyectos llevados a cabo en Belice y Madagascar ⁶²; aunque hoy en día la masticación de chicles con xilitol constituye una estrategia de prevención importante en países desarrollados como los Países Nórdicos ¹⁶.

Entre los principales inconvenientes que se encontraron en la aceptación del protocolo por parte de la dirección del centro, además de su influencia negativa en el desarrollo lectivo normal, fue la permisión de la masticación de chicles durante los horarios de clases, hecho que está prohibido por la legislación interna del centro, al considerarse un mal hábito. Tuvimos que defender nuestro informe admitiendo que en la mayoría de países desarrollados como los Países Nórdicos, se establecen estrategias preventivas importantes de este tipo que son aceptadas positivamente por la población. Les explicamos la importancia que tiene conocer el papel preventivo del chicle, aún desconocido y no implantado en nuestra sociedad, y que debe divulgarse. Sin embargo, entendemos estas justificaciones que nos dio el colegio a la hora de aprobar el protocolo por las dificultades que se presentan al realizar estudios de este tipo. Autio ²¹¹ desarrolló un estudio para valorar el grado de aceptación de programas de masticación de chicles con xilitol mediante cuestionarios realizados a niños y profesores que se sometían a un programa de este tipo. La mayoría de niños aceptaron con agrado la participación en el programa, mientras que a nivel de profesorado la aceptación fue distinta, ya que la mayoría señaló que el estudio influía en la rutina normal de la clase, distraendo en gran medida a los niños. Al preguntarles si querían participar en años posteriores, la mayoría de profesores no aceptó. En nuestro estudio hubo diversidad de opiniones entre las profesoras, y aunque una pequeña minoría reconoció que la actividad influía en el correcto funcionamiento de la clase, la mayoría consideró una actividad productiva para el correcto control del conocimiento de la salud bucal como integrante de la salud general del individuo. Estas dificultades en la aceptación para realizar estudios de este tipo, impide realizar estudios a más largo plazo, como indican Autio y Makinenn y cols ^{161,211}.

Discusión de otros factores de interés relacionados con las variables estudiadas.

Es importante considerar una vez discutidas nuestras variables de estudio, y como analizaremos en la sección perspectivas de futuro, que serán necesarias futuras investigaciones, elaborando registros salivares al mes, a tres meses y seis meses, tras finalizar el tratamiento, ^{140,162} para observar posibles variaciones en cuanto al mantenimiento en la disminución de la concentración de *Streptococcus mutans*. Sin embargo, todos conocemos las dificultades de realizar este tipo de estudios en centros escolares, por la no aceptación del profesorado y los padres, pues justifican que este tipo de actividades influye en el adecuado funcionamiento de la actividad escolar. Así al tener sólo tres mediciones por individuo, no hemos podido realizar técnicas estadísticas de tipo correlacional, donde podríamos analizar más exhaustivamente las variables de estudio.

Varios autores han analizado a partir de que dosis de xilitol se producen los efectos antibacterianos. En general consideran que son necesarias ingestas fraccionadas de como mínimo 5 gr hasta 10 g diarios ^{122,123,162}. Nuestro estudio aunque apoya los mismos resultados, pues el grupo que mastica el menor porcentaje, 5% de xilitol, ya presenta reducciones de las colonias; aunque la reducción óptima se produce en el grupo que mastica 30% de xilitol. Sin embargo en otros estudios ¹²² donde se consumen más de 10 g de xilitol, no se observan reducciones tan significativas. Son necesarios establecer parámetros ajustados para obtener las dosis óptimas de consumo de xilitol en las distintas poblaciones de forma individualizada, para la obtención del máximo éxito en la reducción de las bacterias responsables en el desarrollo de la caries dental.

Frente a estudios anteriores donde hemos realizado los recuentos bacteriológicos apoyándonos en técnicas de manejo similar pero más caras, como son los tests CRT® bacteria; para la realización de este estudio, y como se ha detallado en el apartado de metodología, se han empleado placas AGAR-MITIS-SALIVARIUS elaboradas para el recuento de estas bacterias. Estas técnicas, no tan precisas como otras técnicas más complejas de análisis molecular de ADN ^{44,63,77}, son fáciles de utilizar en la práctica clínica para el recuento de estas bacterias. De este modo todos los profesionales disponemos de una técnica sencilla de recuento de bacterias que nos ayuda a determinar el riesgo de caries de un individuo. En el recuento nos ayudamos de una plantilla, desarrollada por Ivoclar Vivadent®, que facilita el trabajo en la clínica diaria, cuantificando las bacterias, ayudados de una lámpara y un negatoscopio. Podría haberse realizado el recuento mediante técnicas microscópicas; sin embargo, por la finalidad a la práctica clínica, que le damos al estudio creímos conveniente realizar el recuento visualmente, sin métodos de magnificación. Un inconveniente que encontramos en el momento de la lectura de las placas tras la incubación, fue la dificultad en la identificación de las UFC de *Streptococcus mutans*, por la cohabitación de otras especies.

Otro aspecto importante que conviene discutir es el porqué de la elección de los cuatro chicles que se han elegido en el estudio. Elegimos marcas comerciales que se pueden adquirir fácilmente en comercios de compra habitual. Sólo un único tipo de chicle, el que presenta mayor concentración de xilitol, 67% de xilitol no está totalmente introducido en España. En el mercado de chicles español los máximos porcentajes de xilitol se sitúan al 30%, y con la introducción actual de nuevos chicles, de mercado internacional europeo este porcentaje se verá aumentado. El chicle que presenta 67% se puede comprar a nivel de farmacias y/o parafarmacias pues la misma empresa quiere enfocar la venta de chicles con fin preventivo, dando a conocer la importancia del xilitol en la prevención de la caries dental.

Otro de los factores que pueden haber influido negativamente en el estudio, es la continuidad del tratamiento en casa por los niños durante el fin de semana. Se entregaba el último día de clase una bolsita con los seis chicles que debían de masticar durante el fin de semana, y aunque la mayoría de niños decían haber masticado los chicles durante el periodo extraescolar, no se sabe bien si se realizó adecuadamente. En la mayoría de estudios realizados en centros escolares, interrumpen el tratamiento durante el fin de semana, ¹⁶² nosotros creímos conveniente extenderlo a fin de semana para aumentar el aporte de xilitol, responsabilizar del cuidado bucal a los niños e implicar a los padres en el cuidado de la salud oral de sus hijos.

Deberíamos tener en cuenta que los niños participantes en el estudio están integrados en los programas establecidos por la Conselleria de Salud de la Comunidad Valenciana, que reciben revisiones dentales en el centro, donde se les enseña técnicas de instrucción en higiene oral y fluorizaciones semanales

Aceptación o rechazo de las hipótesis.

Según la discusión realizada anteriormente, basada en nuestros resultados tras el análisis estadístico aceptamos como verdaderas las siguientes hipótesis:

1. HO El consumo de chicles edulcorados con xilitol no producen una mayor estimulación de flujo salivar y pH que aquellos que no contienen xilitol en su composición química
2. HO El consumo de chicles con mayor porcentaje de xilitol no produce una mayor estimulación de flujo salivar y pH que aquellos que no contienen xilitol en su composición química.
3. H1 La mayor estimulación de flujo salivar y recuperación de pH se produce antes durante los primeros 14 días de tratamiento.
4. H1 El consumo de chicles edulcorados con xilitol producen una disminución mayor en la concentración de *Streptococcus mutans* en saliva respecto aquellos que no contienen xilitol
5. HO El consumo de chicles con mayor porcentaje de xilitol no producen una disminución mayor en la concentración de *Streptococcus mutans* en saliva
6. H1 La mayor disminución en la concentración de *Streptococcus mutans* se produce durante los primeros 14 días de tratamiento.

CONCLUSIONES

1. La masticación de chicles edulcorados con xilitol producen mayores aumentos de flujo que aquellos que no presentan xilitol en su composición química.
2. La recuperación del pH es independiente a la masticación chicles edulcorados con o sin xilitol.
3. La mayor reducción de los niveles de *Streptococcus mutans* se produce tras la masticación de chicles edulcorados con xilitol, en comparación con la masticación de chicle que no presenta xilitol.
4. La dosis de xilitol incorporada en los chicles no influye de manera proporcional en la disminución de los *Streptococcus mutans*.
5. La mayor estimulación de flujo salivar se produce durante los primeros 14 días de tratamiento.
6. La mayor reducción de los niveles de *Streptococcus mutans* se produce durante los primeros 14 días de tratamiento.

PERSPECTIVAS DE FUTURO

Son necesarios estudios a largo plazo para demostrar el mantenimiento en la reducción de los niveles de *Streptococcus mutans* en determinadas poblaciones. De este modo, podremos incorporar la masticación de chicles edulcorados con xilitol, como una estrategia de control de higiene oral en escuelas para evitar el riesgo de infecciones cruzadas y facilitar problemas de infraestructuras, sin olvidar que la mejor estrategia es el control de la palca dental mediante una técnica de cepillado correcta.

Conocida como es el riesgo de la transmisión vertical de *Streptococcus mutans* de la madre al niño, se necesitan realizar más estudios que establezcan dosis óptimas de xilitol incorporados a chicles como una estrategia más de prevención frente al desarrollo de caries. De igual modo se deben valorar estas reducciones de bacterias relacionadas con disminución de la incidencia de caries en determinadas poblaciones que presenten alto riesgo de caries ²¹².

Debemos tener presente la existencia de chicles con otro tipo de edulcorantes tales como como sorbitol, carbamida, calcio, fosfatos, flúor, pistaecia lenticus, manitol, etc, que aunque no presenten las excelentes propiedades del chicle edulcorado con xilitol, se ha comprobado en distintos estudios que por el hecho de su masticación se produce un aumento de flujo, una recuperación del pH y disminución de la concentración de *Streptococcus mutans* en saliva ^{117,150,174,195,199,200}. Los últimos estudios realizados con chicles que contienen fosfoproteína de caseína, realizados por Lijima y Manton ^{18,119} son el origen de prometedores estudios posteriores para prevenir el desarrollo de la caries dental.

No podemos olvidar los estudios actuales que se están llevando a cabo, donde se incorpora a los chicles una proteína denominada KSL. Esta proteína ataca la membrana celular de las bacterias responsables del inicio de la caries dental e inhibe el crecimiento de estas bacterias orales: las *Streptococcus mutans*. El principal objetivo de este tipo de chicles, aún en fase experimental, es permitir una higiene oral adecuada en aquellos individuos que no son capaces de seguir unas pautas higiénicas dentales rutinarias, ya que inhiben la formación de placa bacteriana. De este modo, se pueden realizar más estudios comparando distintos edulcorantes o excipientes incorporados, pero sin olvidar que el efecto de la masticación es fundamental.

En el ámbito de la tecnología farmacéutica, las industrias farmacéuticas intentan sustituir la sacarosa por edulcorantes no cariogénicos en jarabes y otras formas de presentación para evitar el desarrollo de la caries en pacientes que consumen habitualmente medicación. Sería por tanto desarrollar estudios en pacientes con patología crónica, introduciendo chicles como una estrategia más de prevención frente al desarrollo de la caries ¹³¹⁻³³,

Se han descrito como posibles efectos adversos de la masticación de chicles, el desarrollo de hipertrofias del músculo masetero y alteraciones en la ATM como luxaciones o clics. Se deberían realizar más estudios in vivo e in vitro para determinar a que determinadas fuerzas y frecuencias de consumo se ven observados ^{122,214,215},

Observando detalladamente todos los avances a los que está sometido la ciencia, podemos esperar importantes estudios que confirmen todas estas perspectivas de futuro que hemos analizado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Santos J, Santos C, García B, Rubio EA. ***Índices epidemiológicos de caries de la población escolar atendida en el Centro de Salud de Barbastro.*** Av Odontoestomatol 2005;21(1): 355-60.
2. Bravo M, Casals E, Cortés FJ, Llodra JC. ***Encuesta de salud oral en España 2005.*** RCOE 2006; 2(4): 409-55.
3. Bravo M, Llodra JC, Cortés FJ, Casals E. ***Encuesta de salud oral de preescolares en España 2007.*** RCOE 2007; 12(3): 143-68.
4. Gimeno de Sande *et al.* ***Estudio epidemiológico de la caries dental y patología bucal en España.*** Rev San Hig Pub 1971; 4(1): 361- 433.
5. OMS. Serie de informes técnicos 713. ***Métodos y prevención de las enfermedades bucales*** 1984; 7 (53).
6. Shi S *et al.* ***A follow-up study on three caries activity tests.*** J Clin Pediatr Dent 2003; 27(4): 359-64.
7. Tapias-Ledesma MA *et al.* ***Evolución de la prevalencia de caries en una población infantil de Móstoles entre 1988 y 1997.*** Av Odontoestomatol 2005; 21(6): 333-9.
8. Horowitz AM. ***The public's oral health: the gaps between why we know and what we practice.*** Adv Dent Res 1995; 9: 91-5.
9. Dolado I, Casañas P, Nebot M, Manau C. ***Prevalencia de caries y factores asociados en escolares de 12 años de Barcelona.*** Aten Primaria 1996; 18: 25-33.
10. Freire MCM and Melo RB. ***Dental caries prevalence in relation to socio-economic status of nursery school children in Goiania-go, Brazil.*** Community Dent Oral Epidemiol 1996; 24: 357-61.

11. Kumar JV, Davila ME, Green EL, Liningier LL. ***Evaluation of a school-based sealant program in New York State.*** J Public health Manag Pract 1997; 3: 43-51.
12. Ismail AI and Gagnon P. ***A longitudinal evaluation of fissure sealants applied in dental practices.*** J Dent Res 1995; 74: 1583-90.
13. Tinanoff N and Douglass JM. ***Clinical Decision-Making for Caries management in primary teeth.*** J Dent Educat 2001; 65(10): 1133-42.
14. Barasona P. ***Epidemiología de la caries.*** En: García Barbero ed. Patología y Terapéutica Dental. Madrid: Editorial Síntesis, 2000:137- 45.
15. Koparal E, Ertugrul F, Sabah E. ***Effect of chewing gum on plaque acidogenicity.*** J Clin Pediatr Dent 2000; 24(2): 129- 32.
16. Honkala S, Honkala E, Tynjälä J, Kannas L. ***Use of xylitol chewing gum among Finnish schoolchildren.*** Acta Odonto Scand 1999; 57: 306-9.
17. Mäkinen KK *et al.* ***Physical, chemical, and histologic changes in dentin caries lesions of primary teeth induced by regular use of polyol chewing gums.*** Acta Odonto Scand 1998; 56: 148- 56.
18. Manton DJ *et al.* ***Remineralization of enamel subsurface lesions in situ by the use of three commercially available sugar-free gums.*** Inter J Paediatr Dent 2008; 18: 284-90.
19. Duque de Estrada J, Perez JA, Hidalgo-Gato I. ***Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar.*** Rev Cubana Estomatol 2006; 43(1).
20. Barasona P. ***Historia de la caries.*** En: García Barbero ed. Patología y terapéutica dental. Madrid: Editorial Síntesis, 2000: 129-35.

21. López Molina MI. ***Dieta y salud bucodental.*** Spin Cero. Cuadernos de Ciencia 2006;10: 8-15.
22. Serra LI. ***Dieta, nutrición y salud oral.*** En: Odontología preventiva y comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones. Barcelona: Editorial Masson, 1999: 35-55.
23. Miller WD. ***The microorganisms of the human mouth.*** En: König KG ed. Basel, Switzerland: S Karger, 1973.
24. Seif T. ***Cariología. Prevención, diagnóstico y tratamiento contemporáneo de la caries dental.*** Actualidades médico odontológicas Latinoamericana, CA 1997.
25. Kowash MB, Curzon MEJ, Hart P. ***Association of salivary Streptococcus mutans with caries in young children effect of dental health education on salivary levels.*** Eur J Paediatr Dent 2002; 4: 199-204.
26. Law V and Seow WK. ***A longitudinal controlled study of factors associated with mutans streptococci infection and caries lesion initiation in children 21 to 72 months old.*** Pediatr Dent 2006; 28(1): 58-65.
27. Espasa E y Boj JR. ***Caries dental en el niño.*** En: Odontopediatría. Barcelona: Editorial Masson, 2004: 125-132.
28. Cuenca E. ***Caries: fundamentos actuales de su prevención y control.*** En: Odontología preventiva y Comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones. Barcelona: Editorial Masson, 1999: 15-24.
29. Moreira AL, Paiva E, Ferreira LP. ***Saúde oral infantil: uma abordagem preventiva.*** Rev Port Clin Geral 2006; 22: 337-46.

30. Allukian M. ***The neglected epidemic and the Surgeon General's report: a call to action for better oral health.*** Am J Public Health 2000;90: 843-5.
31. Zero DT. ***Dental caries process.*** Cariology 1999; 43 (4): 635- 61.
32. Facal M, Blanco A, Sieira C, Alonso I. ***Topografía de las caries en los molares temporales y su relación con la edad cronológica.*** Odontol pediater 2002; 10 (3): 11- 5.
33. Baca P. ***Saliva y salud oral.*** En: Odontología preventiva y Comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones. Barcelona: Editorial Masson, 1999: 57-65.
34. Alamoudi N *et al.* ***Salivary characteristics of children and its relation to oral microorganism and lip mucosa dryness.*** J Clin Pediatr Dent 2004; 28 (3): 239- 48.
35. Liébana J, Castillo AM, Gutiérrez J. ***Bacteriología sistemática. Género Streptococcus.*** En: Microbiología oral. México DF: McGraw-Hill Interamericana, 1997: 219-39.
36. Emanuelsson IR and Thornquist E. ***Genotypes of mutans streptococci tend to persist in their host for several years.*** Caries Res 2000; 34(2): 133-9.
37. Kohler B, Andreen I, Jonhsson B. ***The earlier the colonization by mutans streptococci, the higher the caries prevalence at four-years-old age.*** Oral Microbiol Immunol 1988; 3 19:14-7.
38. Masuda N *et al.* ***Longitudinal survey of the distribution of various serotypes of Streptococcus mutans in infants.*** J Clin Microbiol 1979;10(4): 497-502.

- 39.Svanberg M and Krasse B. ***Oral implantation of saliva-treated Streptococcus mutans in man.*** Arch Oral Biol 1981, 26(3): 197-201.
- 40.Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. ***Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity.*** J Dent Res 1993; 72(1): 37-45.
- 41.Mattos-Graner RO *et al.* ***Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12 to 30 month-old children.*** J Dent Res 2000, 79 (6): 1371-7.
- 42.Hirose H *et al.* ***Close association between Streptococcus sobrinus in the saliva of young children and smooth-surface caries increment.*** Caries Res 1993; 27(4): 292-7.
- 43.Rupf S, Merte K, Eschrich K, Kneist S. ***Streptococcus sobrinus in children and its influence on caries activity.*** Eur Arch Paediatr Dent 2006; 7(1): 17-21.
- 44.Berkowitz RJ. ***Mutans streptococci: acquisition and transmission.*** Pediatr Dent 2006; 28(2): 106-9.
- 45.Tanner ACR *et al.* ***The microbiota of young children from tooth and oral tongue samples.*** J Dent Res 2002; 81:53-7.
- 46.Wan AKL *et al.* ***Association of Streptococcus mutans infection and oral developmental nodules in predentale infants.*** J Dent Res 2001,80: 1945-8.
- 47.Wan AKL *et al.* ***Oral colonization of Streptococcus mutans in six-month-old predentate infants.*** J Dent Res 2001; 80: 2060-5.
- 48.Florio FM, Klein MI, Pereira AC, Gonçalves RB. ***Time of initial acquisition of mutans streptococci by human infants.*** J Clin Paediatr Dent 2004; 28(4):303- 8.

49. Chase I *et al.* ***Clinical outcomes for early childhood caries (ECC): the influence of salivary mutans streptococci levels.*** Eur J Paediatr Dent 2004; 3: 143-6.
50. Karn T, O'Sullivan D, Tinanoff N. ***Colonization of mutans streptococci in 8 to 15-month-old children.*** J Publ Health Dent 1998;58: 248-9.
51. Tedjogasongko V and Kozai K. ***Initial acquisition and transmission of mutans streptococci in children at day nursery.*** J Dent Child 2002; 69: 284-8.
52. Davies GN. ***Early childhood caries: a symposium.*** Community Dent Oral Epidemiol 1998; 26(1): 106-16.
53. Hajishengallis G and Michalek SM. ***Current status of a mucosa vaccine against dental caries.*** Oral Microbiol Immunol 1999; 14(1):1-20.
54. Pienihakkinen K and Jokela J. ***Clinical outcomes of risk-based caries prevention in preschool-aged children.*** Community Dent Oral Epidemiol 2002; 30:143-50.
55. Söderling E, Isokangas P, Pienihäkinen K, Tenovuo J. ***Influence of maternal xilitol consumption on acquisition of mutans streptococci by infants.*** J Dent Res 2000; 79: 882-7.
56. Ramos-Gómez FJ *et al.* ***Bacterial behavioral and environmental factors associated with early childhood caries.*** J Clin Paediatr Dent 2002; 26: 165-73.
57. Van Houte J, Jordan HV, Ebersole JL. ***Infectivity and natural transmission of the bacterium Streptococcus mutans in monkeys (Macaca fascicularis) at different ages.*** Arch Oral Biol 1985; 30(4): 345-51.

58. Straetemans MM *et al.* ***Colonization with mutans streptococci after the age of five.*** J Dent Res 1998; 77(10): 1851-5.
59. Grindefjord M *et al.* ***Prevalence of mutans streptococci in one-year-old children.*** Oral Microbiol Immunol 1991; 6(5): 280-3.
60. Alaluusua S, Renkonen OV. ***Streptococcus mutans, establishment and dental caries experience in children from two to four year old.*** Scand J Dent Res 1983; 91(6): 453-7.
61. Gispert E, Rivero A, Castillo E. ***Relación entre el grado de infección por Streptococcus mutans y la posterior actividad cariogénica.*** Rev Cubana Estomatol 2000; 37(3):157-61.
62. Peng B *et al.* ***Can school-based oral health education and a sugar-free chewing gum program improve oral health? Results from a two year study in PR China.*** Acta Odontol Scand 2004; 62: 328- 32.
63. Weinberger SJ and Wright GZ. ***Variables influencing Streptococcus mutans testing.*** Pediatr Dent 1990;12(5): 312-5.
64. Martín J. ***Lactancia materna en España hoy.*** Bol Pediatr 1997; 37: 32-142.
65. van Houte J. ***Role of micro-organisms in caries etiology.*** J Dent Res 1994; 73(3): 672-81.
66. Greenwell AL *et al.* ***Longitudinal evaluation of caries patterns from the primary to the mixed dentition.*** Pediatr Dent 1990; 12(5): 278-82.
67. al-Shalan TA, Erickson PR , Hardie NA. ***Primary incisor decay before age 4 as a risk factor for future dental caries.*** Pediatr Dent 1997; 19(1): 37-41.

68. Baehni PC and Guggenheim B. ***Potential of diagnostic microbiology for treatment and prognosis of dental caries and periodontal diseases.*** Crit Rev Oral Biol Med, 1996; 7(3): 259-77.
69. Grindefjord M, Dahllof G, Modeer T. ***Caries development in children from 2.5 to 3.5 years of age: a longitudinal study.*** Caries Res 1995; 29(6):449-54.
70. Edelstein B and Tinanoff N. ***Screening preschool children for dental caries using a microbial test.*** Pediatr Dent 1989; 11(2):129-32.
71. Splieth C and Bernhardt O. ***Prediction of caries development for molar fissures with semiquantitative mutans streptococci test.*** Eur J Oral Sci, 1999. 107(3):164-9.
72. Anderson M. ***Risk assessment and epidemiology of dental caries: review of the literature.*** Pediatr Dent 2002; 24(5):377-85.
73. Larmas M. ***Saliva and dental caries: diagnostic tests for normal dental practice.*** Int Dent J 1992; 42(4): 199-208.
74. Powell LV. ***Caries prediction: a review of the literature.*** Community Dent Oral Epidemiol 1998; 26(6):361-71.
75. Tinanoff N, Kanellis MJ, Vargas CM. ***Current understanding of the epidemiology mechanisms, and prevention of dental caries in preschool children.*** Pediatr Dent 2002; 24(6):543-51.
76. Sullivan A *et al.* ***Number of mutans streptococci or lactobacilli in a total dental plaque sample does not explain the variation in caries better than the numbers in stimulated whole saliva.*** Community Dent Oral Epidemiol 1996; 24(3): 159-63.

77. Wan AKL and Seow WK. ***Comparison of five selective media for the growth and enumeration of Streptococcus mutans.*** Aust Dent J 2002;47(1): 21-6.
78. Kohler B and Bratthall D. ***Practical method to facilitate estimation of Streptococcus mutans levels in saliva.*** J Clin Microbiol 1979; 9(5): 584-8.
79. Karn TA, O'Sullivan DM, Tinanoff N. ***Colonization of mutans streptococci in 8- to 15-month-old children.*** J Public Health Dent 1998; 58(3): 248-9.
80. Thibodeau EA, O'Sullivan DM, Tinanoff N. ***Mutans streptococci and caries prevalence in preschool children.*** Community Dent Oral Epidemiol 1993; 21(5): 288-91.
81. Roeters FJ *et al.* ***Lactobacilli, mutants streptococci and dental caries: longitudinal study in 2-year-old children up to the age of 5 years.*** Caries Res 1995; 29(4):272-9.
82. O'Sullivan DM and Thibodeau EA. ***Caries experience and mutans streptococci as indicators of caries incidence.*** Pediatr Dent 1996; 18(5): 371-4.
83. Kulkarni GV, Chan KH, Sandham HJ. ***An investigation into the use of restriction endonuclease analysis for the study of transmission of mutans streptococci.*** J Dent Res 1989; 68(7): 1155-61.
84. Aguilera LA, Aceves C, Estrada Garcia IC. ***Detection of potentially cariogenic strains of Streptococcus mutans using the polymerase chain reaction.*** J Clin Pediatr Dent 2002; 27(1): 47-51.
85. Barasona P. ***Etiología de la caries.*** En: García Barbero ed. Patología y Terapéutica Dental. Madrid: Editorial Síntesis, 2000. p. 147- 68.

86. Gibson S and William S. ***Dental caries in pre-school children: associations with social class, toothbrushing habit and consumption of sugar and sugar-containing foods.*** Caries Res 1999; 33: 101- 13.
87. Sundin B and Granath L. ***Sweets and other sugary products tend to be the primary etiologic factors in dental caries.*** Scand J Dent Res 1992; 100: 137-9.
88. Tinanoff N and Palmer CA. ***Dietary determinants of dental caries and dietary recommendations for preschool children.*** J Public Health Dent 2000; 60 (3): 197-206.
89. Lingström P *et al.* ***Dietary factors in the prevention of dental caries: a systematic review.*** Acta Odontol Scand 2003; 61: 331- 40.
90. American Dental Association Health Foundation Research Institute. ***Scientific consensus conference on methods for assessment of the cariogenic potential of food.*** J Am Dent Assoc 1986; 112(4): 535.
91. Powel LV. ***Caries risk assessment: relevance to the practitioner.*** J Am Dent Assoc 1998; 129: 349-53.
92. Tinanoff N. ***Dental caries risk assessment and prevention.*** Dent Clin North Am 1995; 39 (4): 709- 19.
93. Wandera A, Bhakta S, Barker T. ***Caries prediction and indicators using a pediatric risk assessment teaching tool.*** ASDC J Dent Child 2000; 67 (6): 408- 12.
94. Skeie MS, Raadal M, Strand GV, Espelid I. ***Caries in primary teeth at 5 and 10 years of age: a longitudinal study.*** Eur J Paediatr Dent 2004; 4: 194-202.

95. Xalabardé Guàrdia et al. ***Actualización en Odontopediatría 2002.*** Arch Odonto Estomat 2003; 19 (6): 412- 26.
96. Cuenca Sala E. ***Principios de la prevención y promoción de la salud en Odontología.*** En: Odontología preventiva y Comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones. Barcelona: Editorial Masson, 1999.p. 1-11.
97. Caldés S et al. ***¿Una intervención educativa en niños de 12 años de Madrid modifica sus conocimientos y hábitos de higiene buco-dental?*** Av Odontoestomatol 2005; 21(3):149-57.
98. Fernández A et al. ***Estudio clínico sobre el efecto de pastillas comprimidas con xilitol sobre la placa dental y su efecto antimicrobiano.*** Denum 2006;6(2): 52-56.
99. Mount GJ. ***Preservation and restoration of tooth structure.*** Ed Harcourt Brace. Madrid, 1999.
100. Reggiardo PA et al. ***Clinical, research and policy implications of the symposium on the prevention of oral diseases in children and adolescents.*** Pediatr Dent 2006;28(2):192.
101. Källestål C et al. ***Economic evaluation of dental caries prevention: a systematic review.*** Acta Odontol Scand 2003; 61: 341-6
102. Rodríguez M et al. ***Toma de decisiones preventivas en el paciente infantil en función de su edad.*** Odontol pediater 1999; 7 (3): 55-9.
103. López MA et al. ***Encuesta sobre hábitos, actitudes y conocimientos sobre higiene oral en niños de 6-7 años de edad de la CAM.*** Odontol pediater 2002; 10 (1): 17-28.

104. Roshan D, Curzon ME, Fairpo CG. ***Changes in dentists' attitudes and practice in paediatric dentistry.*** Eur J Paediatr Dent 2003; 4 (1): 21- 7.
105. Darout IA, Astrom AN, Skaug N. ***Knowledge and behaviour related to oral health among secondary school students in Khartoum Province, Sudan.*** Int Dent J 2005 : 55 (4): 224-30.
106. Vaitkevicienė V, Milciuvienė S, Zaborskis A. ***Oral hygiene of preschool children in Kansas city and their parents' attitude towards children's oral health.*** Medicina (Kaunas) 2005; 41(5): 427-34.
107. Cate T. ***Glándulas salivales.*** En: Histología oral. Desarrollo, estructura y función. Buenos Aires: Ed Médica Panamericana 1986: 368-99.
108. Glenn R. ***Comparison of submandibular/sublingual salivary flow rates in children and adolescents.*** J Dent Child 2004; 71(1): 38-40.
109. Dowd FJ. ***Saliva and Dental Caries.*** Cariology 1999 ; 43 (4): 579- 95.
110. Aguilera LA, Premoli G, Gonzalez A, Aguilar Rodriguez R. ***Caries risk in children: determined by levels of mutans streptococci and Lactobacillus.*** J Clin Pediatr Dent 2005; 29 (4): 329- 33.
111. Becks H, Wainwright WW. ***Rate of flow of resting saliva of healthy individuals.*** J Dent Res 1943;22:391-6
112. Lourie RS. ***Rate of secretion of the parotid glands in normal children.*** Am J Dis Child 1943;65:455-79

113. Liébana J, Castillo AM, García A. ***Microbiología de las enfermedades bucodentales. Determinantes ecológicos orales.*** En: Microbiología oral. México DF: McGraw-Hill Interamericana 1997:409-28.
114. Rugg-Gun AJ. ***Nutricion, diet and oral health.*** JR Coll Surg Edinb 2001;46(6):320-8.
115. Almerich JM. ***Lesión desmineralizada no cavitada. Perspectivas terapéuticas.*** En: La lesión incipiente de caries. Criterios actuales de diagnóstico, prevención y tratamiento. Valencia: Ed Promolibro,1996:15-36.
116. Kalsbeek H, Verrips GH. ***Consumption of sweet snacks and caries experience of primary school children.*** Caries Res 1994; 28: 477- 83.
117. Chow LC et al. ***Effects on whole saliva of chewing gums containing calcium phosphates.*** J Dent Res 1994; 73 (1): 26-32.
118. Anderson LA, Orchardson R. ***The effect of chewing bicarbonate-containing gum on salivary flow rate and pH in humans.*** Archs Oral Biol 2003 ; 48: 201-4.
119. Lijima Y et al. ***Acid resistance of enamel subsurface lesions remineralized by a sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate.*** Caries Res 2004, 38:551-6.
120. Anderson M. ***Clorhidine and xylitol gum in caries prevention.*** Spec Care Dentist 2003; 25(5):173-6
121. Lif Holgerson P, Sjöström I, Twetman S. ***Decreased salivary uptake of [¹⁴C] xylitol after a four-week xylitol chewing gum regimen.*** Oral Health Prev Dent 2007;5:313-9.

122. Ly KA, Milgrom P, Rothen M. ***Xylitol sweeteners and dental caries.*** *Pediatr Dent* 2006;28 (2):154-63.
123. Milgrom P *et al.* ***Mutans streptococci dose response to xylitol chewing gum.*** *J Dent Res* 2006;85(29): 177-81.
124. Autio JT. ***Effect of xylitol chewing gum on salivary streptococcus mutans in preschool children.*** *J Dent Child* 2002; 81-6.
125. Litt MD, Reisine S, Tinanoff N. ***Multidimensional causal model of dental caries development in low-income preschool children.*** *Public health report* 1995; 110(5): 607-17.
126. Makinen KK *et al.* ***Properties of whole saliva and dental plaque in relation to 40-month consumption chewing gums containing xylitol, sorbitol or sucrose.*** *Caries Res* 1996;30: 180-8.
127. Soderling E *et al.* ***Effect of sorbitol, xylitol and xylitol/sorbitol chewing gums on dental plaque.*** *Caries Res* 1989; 23: 378- 84.
128. Bader JD, Shugars OA, Bonito AJ. ***A systematic review of selected caries prevention and management methods.*** *Community Dent Oral Epidemiol* 2001; 29: 399-411.
129. *Alcoholes Azúcares: Xilitol.* Rodolfo Larosa. 2002. www.zoetecnocampo.com/Documentosibiodie_lar/xilitol.htm
130. Mäkinen KK. ***Biochemical principles of the use of xilitol in medicine and nutrition with special consideration of dental aspects.*** Birkhäuser Basilea 1978; 160.
131. Grillaud M *et al.* ***Les polyols en odontologie pédiatrique: intérêt du xylitol.*** *Arch pédiatr* 2005; 12: 1180-6.

132. Maguire A, Baquir W, Nunn JH. ***Are sugar-free medicines more erosive than sugars-containing medicines? An in vivo study of paediatric medicines with prolonged oral clearance used regularly and long-term by children.*** Int J Paediatr Dent 2007; 17: 231-8.
133. Maguire A, Rugg-Gunn AJ, Butler TJ. ***Dental health of children taking antimicrobial and non-antimicrobial liquid oral medication long-term.*** Caries Res 1996;30:16-21
134. Edgar WM. ***Sugar substitutes, chewing gum and dental caries: a review.*** Br Dent J 1998; 184 (1): 29-32.
135. Rioboo R. ***Dieta y nutrición.*** En: Higiene y prevención en odontología individual y comunitaria. Barcelona: ediciones Avance 1994;15: 359-85.
136. Lino CM *et al* ***Estimated intake of the sweeteners, acesulfame-K and aspartame, from soft drinks, soft drinks based on mineral waters and nectars for a group of Portuguese teenage students.*** Food Addit Contam. 2008 Aug 20:1-6
137. www.amcmh.org/pagAMC/medicina/articulopdf/65aspartamo.pdf
138. Kranz S, Smiciklas-Wright H, Francis LA. ***Diet quality, added sugars and dietary fiber intakes in American Preschoolers.*** Pediatr Dent 2006;28(2):164-71.
139. Lovely HT, Kowitz AA. ***Dentistry on stamps: Chewing Gum.*** J Hist Dent 2006;54(2):80.
140. Hildebrant GH, Sparks BS. Maintaining ***mutans sterptococci supression with xilitol chewing gum*** J Am Dent Assoc 2000; 131:909-16.

141. Nakata M. ***Masticatory function and its effects on general health.*** Int Dent J 1998; 48:540-48.
142. www.infoaliment.com/notasprensa/4/50121_2htm
143. Pelczar MR. ***Chewing gum.*** J Am dent Assoc 2008;139(9).
144. Alanen P, Isokangas P, Gutmann K. ***Xylitol candies in caries prevention: results of a field study in Estonian children.*** Community Dent Oral Epidemio 2000; 28: 218-24.
145. Twetman S, Stecksén-Blicks C. ***Effect of xylitol-containing chewing gums on lactic acid production in dental plaque from caries active pre-school children.*** Oral Health Prev Dent 2003; 1 (3): 195- 9.
146. Itthagarun A, Wei SH. ***Chewing gum and saliva in oral health.*** J Clin Dent 1997; 8: 159-62.
147. Gopinath VK, Tandon S, Shirwaikar A. ***The effect of Chewing gums on acidogenicity of plaque after a sucrose challenge.*** J Clin Pediatr Dent 1997; 22: 77- 81.
148. Aguirre-Zero O, Zero DT, Proskin HM. ***Effect of chewing xylitol chewing gum on salivary flow rate and the acidogenic potencial of dental plaque.*** Caries Res 1993; 27: 55- 9.
149. Dodds MWJ, Hsieh SC, Johnson DA. ***The effect of increased mastication by daily gum-chewing on salivary gland output and dental plaque acidogenicity.*** J Dent Res 1991; 70: 1474-8.
150. Maaning RH, Edgar WM, Agalamanyi EA. ***Effect of Chewing gums sweetened with sorbitol or a sorbitol/xylitol mixture on the remineralisation of human enamel lesions in situ.*** Caries Res 1992; 26: 104- 9.

151. Szöke J, Bánóczy J, Proskin HM. ***Effect of after-meal sucrose-free gum-chewing on clinical caries.*** J Dent Res 2001; 80 (8): 1725-9.
152. Simons D, Beighton D, Kidd EAM, Collier FI. ***The effect of xylitol and clorhexidina acetate/xylitol chewing gums on plaque accumulation and gingival inflammation.*** J Clin Periodontol 1999; 26: 388-91.
153. Van Loveren C. ***Sugar alcohols: what is the evidence for caries- preventive and caries-therapeutic effects?*** Caries Res 2004; 38 (3): 286-93.
154. Park KK *et al.* ***Effect of chewing gums on plaque pH after a sucrose challenge.*** J Dent Child 1995; May-June:180-6.
155. Park KK, Schemehorn BR, Stookey GK. ***Effect of time and plaque acidogenicity.*** Pediatr Dent 1993;15(3): 197-202.
156. Hanham A, Addy M. ***The effect of chewing sugar-free gum on plaque regrowth at smooth and occlusal surfaces.*** J Clin Periodontol 2001;28:255-7.
157. Jensen ME, Wefel JS. ***Human plaque pH responses to meals and the effects of chewing gum.*** Br Dent J 1989; 167:204-8.
158. Isokangas P, Alanen P, Tiekso J, Makinen KK. ***Xylitol chewing gum in caries prevention: a field study in children.*** J Am Dent Assoc 1988; 117: 315-20.
159. Birkhed D *et al.* ***Effects of three months frequent consumption of hydrogenated starch hydrolysate (Lycasin®), maltitol, sorbitol and xylitol on human dental plaque.*** Acta Odontol Scand 1979; 37:103-15.

160. Tenouvo *et al.* ***Release of cariostatic agents from a new buffering fluoride and xylitol-containing lozenge to human whole saliva in vivo.*** J Oral Rehabil 1997; 24: 325-31.
161. Makinen KK *et al.* ***Stabilisation of rampant caries. Polyol gums and arrest of dentine caries in two long-term cohort studies in young subjects.*** Int Dent J 1995;45:93-103.
162. Holgerson PL, Stecksén-Blicks C, Sjöström I, Twetman S. ***Effect of xylitol-containing chewing gums on interdental plaque-pH in habitual xylitol consumers.*** Acta Odonto Scand 2005; 63: 233-8.
163. Mäkinen KK. ***The rocky road of xylitol to its clinical application.*** J Dent Res 2000; 79: 1352-5.
164. Peldyak J, Mäkinen KK. ***Xylitol for caries prevention.*** J Dent Hyg 2002; 76: 276- 85.
165. Ramon RM. ***El efecto anticaries del chicle edulcorado con xilitol.*** Informe Técnico de Sespo 2000; 5.
166. Trahan L. ***Xylitol: a review of its action on mutans streptococci and dental plaque, its clinical significance.*** Int Dent J 1995; 45: 77-92.
167. Machiulskiene V, Nyvad B, Baelum V. ***Caries preventive effect of sugar-substituted chewing gum.*** Community Dent Oral Epidemiol 2001; 29: 278- 88.
168. Loesche WJ, Grossman NS, Earnest R, Corpron R. ***The effect of chewing xylitol gum on the plaque and saliva levels of Streptococcus mutans.*** J Am Dent Assoc 1984 ; 108: 587- 92.

169. Mäkinen KK *et al.* ***Six-month polyol chewing-gum programme in kindergarten-age children: a feasibility study focusing on mutans streptococci and dental plaque.*** Int Dent J 2005; 55(2): 81- 8.
170. Kandelman D, Gagnon G. ***A 24-month clinical study of the incidence and progression of dental caries in relation to consumption of chewing gum containing xylitol in school preventive programs.*** J Dent Res 1990;69:1771-5.
171. Glass R. ***A two-year clinical trial of sorbitol chewing-gum.*** Caries Res 1983; 17: 365-8.
172. Hujoel PP *et al.* ***The optimum time to intake habitual xylitol gum chewing for obtaining long-term caries prevention.*** J Dent Res 1999;78:797-803.
173. Trahan *et al.* ***Effect of xylitol consumption on the plaque saliva distribution of mutans streptococci and the occurrence and long-term survival of xylitol resistance strains.*** J Dent Res 1992;71. 1785-91.
174. Thorild I, Lindau B, Twetman S. ***Salivary mutans streptococci and dental caries in three-year-old children after maternal exposure to chewing gums combinations of xylitol, sorbitol, chlorhexidine, and fluoride.*** Acta Odontol Scand 2004; 62: 245- 50.
175. Isokangas P, Soderling E, Pienihakkinen K, Alanen P. ***Occurrence of dental decay in children after maternal consumption of xylitol chewing gum a follow-up from 0 to 5 years of age.*** J Dent Res 2000;79:1885-9.
176. Xalabardé i Guàrdia A *et al.* ***Actualización en Odontopediatría 2000.*** Arch Odonto Estomatol 2001; 1 (5): 347-63

177. Yoshihara A, Shiloko S, Kobayashi S, Miyazaki H. ***Antimicrobial effect of fluoride mouthrinse on mutans streptococci and lactobacilli in saliva.*** *Pediatr Dent* 2001; 23(2):113-17.
178. FDI. Technical report N31. ***Review of methods of identification of high caries risk group and individuals.*** *Int Dent J*, 1998; 38: 177-89.
179. Öztas N *et al.* ***The efficacy of a fluoride chewing gum on salivary fluoride concentration and plaque pH in children.*** *J Dent* 2004; 32: 471-7.
180. Giuca MR, Saracino S, Giannotti E, Ceccarini A. ***Oral clearance of NaF from chewing gum and tablets in children and adults.*** *Eur Paediatr Dent* 2007;1: 19-24.
181. Ainamo J, Nieminen A, Westerlund U. ***Optimal dosage of clorhexidina acetate in chewing gum.*** *J Clin Periodontol* 1990, 17:729-33.
182. Alanen P, Holsti ML, Pienihäkkinen K. ***Sealants and Xylitol chewing gum are equal in caries prevention.*** *Acta Odontol Scand* 2000; 58: 279- 84.
183. Proskin HM, Kingman A, Naleway C, Wozniak WT. ***Comparative attributes for the description of the relative efficacy of therapeutic agents: general concepts and definitions and applications to the American Dental Association guidelines for the comparison of the clinical anticaries efficacy of fluoride dentifrices.*** *J Clin Dent* 1995; 6:176- 84.
184. Seki M, Yamashita Y. ***Decreasing caries prevalence in Japanese preschool children is accompanied with a reduction in mutans streptococci infection.*** *Int Dent J* 2005; 55 (2): 100- 4.

185. Edgar WM, Bibby BG, Mundorff S, Rowley J. ***Acid production in plaques after eating snacks: modifying factors in foods.*** JADA 1975; 90: 418-25.
186. Rugg-Gunn AJ, Edgar WM, Jenkins GN. ***The effect of eating some British snacks upon the pH of human dental plaque.*** Br Dent J 1978; 145: 95-100.
187. Scheinin A, Mäkinen KK, Tamissalo E, Rekola M. ***Turku Sugar studies XVIII. Incidence of dental caries in relation to 1-year consumption of xylitol chewing gum.*** Acta Odont Scand 1975; 33: 269-78.
188. Kandelman D, Gagnon G. ***A 24-month study of the incidence and progression of dental caries in relation to consumption of chewing gum containing xylitol in school preventive programs.*** J Dent Res 1990; 69: 1771-5.
189. Beiswanger et al. ***The effect of chewing gum sugar-free gum after meals on clinical caries incidence.*** JADA 1998;129: 1623-6.
190. Tanzer JM. ***Xylitol chewing gum and dental caries.*** Int Dent J 1995;45:65-76.
191. Hayes C. ***The effect of non-cariogenic sweeteners on the prevention of dental caries: a review of the evidence.*** J Dent Educ 2001;65: 1106-9.
192. Ribelles Llop Marta. ***Efectos del chicle edulcorado con xilitol sobre el flujo salivar, Ph, capacidad tampón y presencia de Streptococcus mutans en la saliva.*** Barcelona: Universitat Internacional de Catalunya. Departamento de Oodntopediatria, 2007.

193. Dong C, Dawes C ***The effects of blindfolding and blindness on the unstimulated and chewing-gum stimulated flow rates of whole saliva.*** Archs Oral Biol 1995; 40 (8): 771- 5.
194. Stecksen-Blicks C y cols. ***Effect of xylitol on mutans streptococci and lactic acid formation in saliva and plaque from adolescents and young adults with fixed orthodontic appliances.*** Eur J Oral Sci 2004;12 (3) : 244-8.
- 195.** Isotupa KP y cols. ***Effect of polyol gums on dental plaque in orthodontic patients. Am J Orthod 1995; 107 (5): 497-504.***
196. Sas R, Dawes C. ***The intra-oral distribution of unstimulated and chewing-gum stimulated parotid saliva.*** Archs Oral Biol 1997; 42 (7): 469-74.
- 197.** Leach SA, Lee GTR, Edgar WM. ***Remineralization of artificial caries-like lesions in human enamel in situ by chewing sorbitol gum.*** J Dent Res 1989; 68: 1064-8.
198. Masalin K. ***Caries-risk-reducing effects of xylitol containing chewing gum and tablets in confectionary workers in Finland.*** Community Dent Health 1992; 9:3-10.
199. Aksoy A, Duran N, Koksall F. ***In vitro and in vivo antimicrobial effects of mastic chewing gum against Streptococcus mutans and mutans streptococci.*** Archs Oral Biol 2005: 1-6.
200. Dawes C, Kubieniec K. ***The effects of prolonged gum chewing on salivary flow rate and composition.*** Archs Oral Biol 2004; 49: 665-9.

201. Manning RH, Edgar WM. ***pH changes in plaque after eating snacks and meals, and their modification by chewing sugared or sugar-free gum.*** Br Dent J 1993; 174: 241-4.
202. Olilla PSH, Larmas MA. ***Long-term predictive value of salivary microbial diagnostic tests in children.*** Eur Arch Paediatr Dent 2008;9(1):25-30.
203. Weinberg SJ, Wright GZ. ***A comparison of Streptococcus mutans clinical assessment methods.*** Pediatr Dent 1990;12:375-9.
204. Gabre P, Martinsson T, Gahnberg L. ***Simplified sampling methods for estimating levels of lactobacilli in saliva in dental practice.*** Acta Odontol Scand 1999;57:181-4.
205. Söderling E, Trahan L, Tammiala-Salonen T, Häkinen L. ***Effects of xylitol, xylitol-sorbitol, and placebo chewing gums on the plaque of habitual xylitol consumers.*** Eur J Oral Sci 1997; 105: 170-7.
206. Gazi MI. ***The finding of antiplaque features in Acacia Arabica type of chewing gum.*** J Clin Periodontol 1991;18: 75-7.
207. Elemadzadeh H. ***Plaque-growth inhibiting effect of chewing gum containing urea hydrogen peroxide.*** J Clin Periodontol 1991;18: 337-40.
208. Smith AJ *et al.* ***The efficacy of an anti-gingivitis chewing gum.*** J Clin Periodontol 1996;23:19-23.
209. Burt B. ***The use of sorbitol and xylitol sweetened chewing gum in caries control.*** JADA 2006;137: 190-6.

210. Kovari H, Pienihäkkinen K, Alanen P. ***Use of xylitol chewing gum in daycare centres: a follow-up study in Savonlinna, Finland.*** Acta Odontol Scand 2003; 61: 367- 70.
211. Autio JT, Courts FJ. ***Acceptance of the xylitol chewing gum regimen by preschool children and teachers in a Head Start program: a pilot study.*** Pediatr Dent 2001;23(1): 71-4.
212. Thorild I. ***Caries in 4-year-old children after maternal chewing of gums containing combinations of xylitol,sorbitol,clorhexidine and fluoride.*** Eur Arch Paediatr Dent 2006; 7(4):241-5
213. Dong Hee N *et al.* ***Chewing gum of antimicrobial decapeptide (KSL) as a sustained antiplaque agent: Preformulation study.*** J Con Rel 2005; 107: 122-30.
214. Shimazaki K *et al.* ***Functional relationships between the masseter and sternocleidomastoid muscle activities during gum chewing: the effect of experimental muscle fatigue.*** Angle Orthodontist 2006; 76(3): 452-8

A_{NEXOS}

A continuación se presentan las cartas para la obtención de los consentimientos informados por parte de la dirección del centro escolar donde se realizó el estudio al igual que la remitida a los padres de los niños participantes para explicarles el diseño del mismo. Al finalizar el estudio se envió a los padres una carta de agradecimiento por permitir la participación de sus hijos, que también se adjunta en este anexo.

Junto a las cartas hemos añadido todos los registros obtenidos en cada una de las tres mediciones realizadas a los niños que reciben los cuatro tipos de chicles.



Sant Cugat del Vallés, 22 de Mayo 2008

Apreciada Sra. Ana Mezquita Broch:

El dentista tiene un papel crucial para enseñar a los niños y jóvenes como cuidar sus dientes. Junto a las revisiones dentales regulares y consejos sobre una buena higiene bucal, padres e hijos necesitan comprender la importancia de una dieta sana, desde una edad temprana. Diversos estudios demuestran como la masticación de chicles sin azúcar, puede incluirse como una estrategia más en el cuidado de la salud bucodental. De este modo, los niños pueden al mismo tiempo que se divierten, ayudar a proteger sus dientes frente al desarrollo de la caries.

Desde la Facultad de Odontología de la Universidad Internacional de Catalunya (Sant Cugat), mediante la Srta. Marta Ribelles, queremos realizar estudios de investigación en el Colegio "Nuestra Señora de la Consolación" de Vila-real, para reafirmar estudios importantes desarrollados en países como Finlandia, Suecia y Alemania. Éstos estudios, demuestran como la masticación con chicles edulcorados con xilitol, contribuye en la prevención de la caries dental al controlar diversos factores salivares que se ven alterados tras la ingesta de hidratos de carbono.

Estos estudios serán realizados durante los meses de Mayo-Junio del 2008.

Agradeceríamos su colaboración, si permitiera que sus alumnos participaran en el estudio, para mejorar el control de la higiene oral en la población escolar.

Atentamente

Sr. Ignasi Puig

Secretario Departamento de Odontología.



Sant Cugat del Vallés, 23 de Mayo 2008

Apreciados padres:

El dentista tiene un papel crucial para enseñar a los niños y jóvenes como cuidar sus dientes. Junto a las revisiones dentales regulares y consejos sobre una buena higiene bucal, padres e hijos necesitan comprender la importancia de una dieta sana, desde una edad temprana. Diversos estudios demuestran como la masticación de chicles sin azúcar, puede incluirse como una estrategia más en el cuidado de la salud bucodental. De este modo, los niños pueden al mismo tiempo que se divierten, ayudar a proteger sus dientes frente al desarrollo de la caries.

Desde la Facultad de Odontología de la Universitat Internacional de Catalunya (Sant Cugat), estamos realizando estudios de investigación para reafirmar estudios importantes desarrollados en países como Finlandia, Suecia y Alemania. Éstos estudios, demuestran como la masticación con chicles edulcorados con xilitol, contribuye en la prevención de la caries dental al controlar diversos factores salivares que se ven alterados tras la ingesta de hidratos de carbono.

Por tanto el estudio se basará en la masticación de tres chicles diarios, dos por la mañana y uno por la tarde durante un periodo de 28 días. Deberán masticar durante 5 minutos cada uno de los chicles bajo la supervisión de personal cualificado. Durante este periodo de 28 días la investigadora deberá realizar registros de muestras de saliva durante 3 días (el primer día, a los 14 y a los 28 días), para demostrar cómo se va produciendo una disminución en la concentración de los *Streptococcus mutans*, microorganismos responsables en el desarrollo de la caries dental. De igual modo, durante este mes, se realizarán revisiones dentales gratuitas para todos los niños participantes en el estudio.

Una vez finalizado el estudio, desde la Facultad de Odontología de la Universitat Internacional de Catalunya nos comprometemos a enviar los resultados del estudio, así como los artículos previstos para publicarse en revistas científicas a nivel nacional e internacional.

Agradeceríamos su colaboración, si permitieran que sus hijos participaran en el estudio, para mejorar el control de la higiene oral en la población escolar.

Atentamente

Licenciada en Odontología. Master Odontopediatría



Sant Cugat del Vallés, 20 de junio de 2008

Apreciados padres:

El motivo principal de dirigirme a ustedes es para agradecerles enormemente la amabilidad que han tenido de permitir que sus hijos participen en el estudio que estoy realizando, para la obtención de la Tesis Doctoral que lleva por título: " Efecto de la masticación de distintas concentraciones de chicles edulcorados con xilitol en la disminución de Streptococos mutans".

Es importante destacar el trabajo realizado por la Directora del centro, Doña Ana Mezquita Broch para obtener un grupo de gran número de niños, para poder realizar el estudio. De igual modo, resulta digno de agradecer también el papel de los niños que colaboran durante el horario escolar y extraescolar, ya que sin ellos nada sería posible. De igual modo la gran satisfacción personal que me ha producido durante las tres ocasiones que he asistido al colegio para obtener las muestras de saliva, el hecho de recibirme con una gran sonrisa facilita en gran medida el trabajo, al mismo tiempo que te ayuda a seguir con la investigación con gran ilusión, a pesar de las dificultades. Nosotros, los odontopediatras tenemos un gran trabajo en evitar que se implante la enfermedad en la boca de estos niños y que su sonrisa se mantenga sana día a día.

Padres y odontopediatras debemos trabajar conjuntamente para motivar a los niños en el control diario de su salud bucal: cepillado de dientes, evitar el consumo de dietas ricas en sacarosa y el empleo de otras estrategias preventivas como el uso del flúor y la masticación de chicles sin azúcar. Los chicles sin azúcar, y especialmente aquellos edulcorados con xilitol, producen con su efecto de autolimpieza y disminución de los microorganismos responsables del desarrollo de la misma, una reducción del riesgo de caries. Sus hijos, tras la masticación de los chicles con xilitol, han obtenido una mejora en las defensas de la cavidad oral, frente al desarrollo de la caries dental.

Próximamente, al inicio del curso se facilitará al colegio un informe detallado sobre el estudio.

Atentamente

Marta Ribelles Llop

Licenciada en Odontología. Práctica exclusiva Odontopediatria

OBSERVACIONES MUESTRALES

TRATAMIENTO	TIEMPO	FLUJO	PH	SM	EDAD	SEXO
X30	1	16	4	2	6	1
X30	1	3	4	2	6	1
X30	1	3	5	3	6	1
X30	1	10	4	4	6	2
X30	1	2	5	4	6	1
X30	1	8	5	4	6	2
X30	1	6	7	4	6	1
X30	1	4	6	3	6	1
X30	1	4	4	3	6	1
X30	1	8	4	4	6	1
X30	1	7	4	4	6	1
X30	1	9	4	4	6	2
X30	1	10	5	4	6	2
X30	1	8	5	4	6	2
X30	1	4	4	2	6	2
X30	1	3	5	4	6	1
X30	1	7	4	2	6	2
X30	1	6	5	3	6	2
X30	1	10	4	4	6	1
X30	1	10	7	4	6	2
X30	1	6	6	3	6	2
X30	1	10	7	2	9	1
X30	1	13	6	4	9	2
X30	1	7	6	4	9	2
X30	1	5	8	4	9	2
X30	1	5	8	4	9	1
X30	1	11	8	3	9	1
X30	1	5	5	4	9	1
X30	1	3	7	4	9	1
X30	1	12	5	4	9	1
X30	1	4	7	4	9	2
X30	1	10	4	4	9	1
X30	1	13	5	4	9	1
X30	1	14	5	4	9	1
X30	1	20	5	4	9	2
X30	1	13	4	3	9	2
X30	1	6	5	2	9	2
X30	1	8	6	4	9	2
X30	1	7	7	4	9	2

TRATAMIENTO	TIEMPO	FLUJO	PH	SM	EDAD	SEXO
X30	2	5	4	2	6	1
X30	2	8	4	3	6	1
X30	2	2	3	3	6	1
X30	2	10	4	3	6	2
X30	2	3	4	2	6	1
X30	2	10	5	2	6	2
X30	2	14	8	2	6	1
X30	2	3	6	3	6	1
X30	2	3	3	2	6	1
X30	2	13	5	3	6	1
X30	2	13	5	2	6	1
X30	2	8	5	2	6	2
X30	2	5	4	3	6	2
X30	2	8	6	2	6	2
X30	2	7	5	3	6	2
X30	2	10	5	2	6	1
X30	2	10	5	3	6	2
X30	2	10	7	2	6	2
X30	2	10	4	3	6	1
X30	2	14	5	3	6	2
X30	2	10	7	3	6	2
X30	2	12	7	2	9	1
X30	2	7	5	3	9	2
X30	2	10	5	3	9	2
X30	2	5	6	3	9	2
X30	2	3	7	3	9	1
X30	2	10	7	2	9	1
X30	2	5	5	4	9	1
X30	2	5	5	3	9	1
X30	2	8	5	3	9	1
X30	2	3	7	2	9	2
X30	2	6	6	3	9	1
X30	2	13	5	3	9	1
X30	2	15	7	3	9	1
X30	2	10	7	3	9	2
X30	2	8	6	2	9	2
X30	2	5	5	2	9	2
X30	2	10	6	2	9	2
X30	2	8	5	2	9	2

TRATAMIENTO	TIEMPO	FLUJO	PH	SM	EDAD	SEXO
X30	3	8	4	1	6	1
X30	3	3	4	1	6	1
X30	3	2	5	2	6	1
X30	3	10	6	2	6	2
X30	3	2	6	2	6	1
X30	3	9	4	2	6	2
X30	3	12	5	2	6	1
X30	3	6	4	2	6	1
X30	3	2	4	2	6	1
X30	3	10	5	3	6	1
X30	3	11	4	2	6	1
X30	3	7	5	2	6	2
X30	3	5	4	2	6	2
X30	3	7	4	2	6	2
X30	3	9	5	2	6	2
X30	3	2	3	2	6	1
X30	3	15	5	2	6	2
X30	3	6	6	4	6	2
X30	3	10	5	3	6	1
X30	3	14	5	2	6	2
X30	3	9	7	3	6	2
X30	3	5	3	2	6	1
X30	3	1	9	2	9	2
X30	3	3	8	3	9	2
X30	3	1	9	3	9	2
X30	3	1	9	2	9	1
X30	3	2	8	3	9	1
X30	3	1	8	4	9	1
X30	3	1	7	3	9	1
X30	3	2	6	3	9	1
X30	3	4	7	2	9	2
X30	3	1	7	3	9	1
X30	3	5	7	2	9	1
X30	3	5	7	2	9	1
X30	3	5	8	2	9	2
X30	3	6	7	2	9	2
X30	3	2	8	2	9	2
X30	3	4	9	2	9	2
X30	3	2	8	2	9	2

TRATAMIENTO	TIEMPO	FLUJO	PH	SM	EDAD	SEXO
X5	1	7	6	4	9	1
X5	1	11	6	3	9	2
X5	1	16	7	4	9	2
X5	1	6	7	3	9	2
X5	1	11	7	3	9	2
X5	1	8	5	4	9	2
X5	1	10	6	4	9	1
X5	1	8	6	4	9	1
X5	1	4	6	2	9	1
X5	1	7	5	3	9	1
X5	1	10	5	4	9	1
X5	1	6	6	3	9	1
X5	1	12	6	4	9	2
X5	1	6	6	4	9	2
X5	1	3	9	3	9	2
X5	1	12	6	3	6	1
X5	1	2	7	3	6	1
X5	1	13	6	3	6	1
X5	1	7	8	3	6	1
X5	1	8	5	3	6	1
X5	1	16	4	4	6	2
X5	1	11	6	4	6	1
X5	1	9	5	2	6	2
X5	1	12	6	3	6	2
X5	1	4	6	2	6	2
X5	1	8	4	3	6	1
X5	1	12	8	2	6	2
X5	1	19	6	3	6	2
X5	1	2	7	3	6	2
X5	1	4	7	2	6	2
X5	1	10	6	3	6	2
X5	1	16	6	3	6	2
X5	1	9	6	4	6	2
X5	1	10	6	4	6	2
X5	1	8	7	3	6	1
X5	1	13	6	4	6	1
X5	1	2	8	2	6	2

TRATAMIENTO	TIEMPO	FLUJO	PH	SM	EDAD	SEXO
X5	2	10	7	3	9	1
X5	2	14	6	3	9	2
X5	2	20	8	2	9	2
X5	2	4	5	2	9	2
X5	2	15	7	3	9	2
X5	2	10	5	3	9	2
X5	2	13	5	2	9	1
X5	2	10	6	2	9	1
X5	2	4	6	2	9	1
X5	2	15	8	2	9	1
X5	2	15	7	2	9	1
X5	2	13	8	2	9	1
X5	2	20	6	3	9	2
X5	2	12	7	2	9	2
X5	2	7	7	3	9	2
X5	2	15	8	3	9	1
X5	2	2	8	2	6	1
X5	2	13	6	3	6	1
X5	2	5	7	2	6	1
X5	2	10	7	3	6	1
X5	2	20	8	2	6	2
X5	2	15	7	2	6	1
X5	2	10	7	2	6	2
X5	2	12	6	2	6	2
X5	2	7	5	2	6	2
X5	2	7	4	3	6	1
X5	2	15	7	2	6	2
X5	2	20	8	2	6	2
X5	2	2	5	3	6	2
X5	2	9	7	3	6	2
X5	2	10	6	3	6	2
X5	2	16	6	3	6	2
X5	2	12	5	3	6	2
X5	2	12	7	2	6	2
X5	2	15	8	2	6	1
X5	2	14	6	3	6	1
X5	2	1	7	2	6	2

TRATAMIENTO	TIEMPO	FLUJO	PH	SM	EDAD	SEXO
X5	3	10	7	3	9	1
X5	3	10	7	3	9	2
X5	3	20	8	2	9	2
X5	3	1	8	2	9	2
X5	3	20	8	2	9	2
X5	3	10	5	2	9	2
X5	3	14	6	2	9	1
X5	3	5	6	2	9	1
X5	3	4	5	2	9	1
X5	3	15	8	2	9	1
X5	3	15	6	3	9	1
X5	3	14	6	3	9	1
X5	3	19	7	3	6	2
X5	3	12	5	3	6	2
X5	3	4	6	2	6	2
X5	3	15	6	3	6	1
X5	3	2	4	2	6	1
X5	3	5	6	2	6	1
X5	3	5	7	3	6	1
X5	3	10	6	3	6	1
X5	3	17	7	3	6	2
X5	3	16	6	2	6	1
X5	3	9	6	1	6	2
X5	3	10	6	2	6	2
X5	3	2	4	2	6	2
X5	3	7	4	2	6	1
X5	3	15	8	2	6	2
X5	3	20	6	3	6	2
X5	3	1	6	2	6	2
X5	3	6	6	2	6	2
X5	3	9	6	1	6	2
X5	3	10	6	1	6	2
X5	3	8	4	2	6	2
X5	3	9	6	2	6	2
X5	3	15	7	2	6	1
X5	3	20	7	2	6	1
X5	3	2	8	2	6	2

TRATAMIENTO	TIEMPO	FLUJO	PH	SM	EDAD	SEXO
X67	1	9	8	3	12	1
X67	1	5	8	3	12	1
X67	1	5	8	3	12	2
X67	1	7	9	3	12	2
X67	1	3	8	3	12	1
X67	1	10	8	3	12	1
X67	1	6	7	2	12	1
X67	1	3	9	3	12	1
X67	1	7	8	3	12	1
X67	1	9	8	4	12	2
X67	1	5	8	4	12	2
X67	1	6	8	4	12	1
X67	1	5	7	4	12	1
X67	1	8	8	4	12	2
X67	1	10	8	3	12	2
X67	1	6	8	4	12	2
X67	1	8	8	3	12	2
X67	1	7	8	2	12	2
X67	1	2	8	3	12	1
X67	1	6	8	3	10	1
X67	1	3	8	3	10	1
X67	1	7	8	2	10	2
X67	1	4	7	4	10	1
X67	1	5	8	4	10	1
X67	1	7	8	3	10	1
X67	1	5	8	3	10	2
X67	1	5	7	3	10	1
X67	1	10	8	2	10	1
X67	1	9	8	4	10	1
X67	1	3	7	2	10	1
X67	1	7	8	4	10	2
X67	1	8	8	3	10	1
X67	1	4	8	3	10	1
X67	1	7	9	4	10	1
X67	1	10	8	3	10	1
X67	1	4	8	4	10	2

TRATAMIENTO	TIEMPO	FLUJO	PH	SM	EDAD	SEXO
X67	2	10	8	3	12	1
X67	2	7	8	4	12	1
X67	2	7	8	3	12	2
X67	2	11	8	3	12	2
X67	2	4	8	4	12	1
X67	2	10	7	4	12	1
X67	2	9	7	2	12	1
X67	2	10	7	3	12	1
X67	2	7	7	2	12	1
X67	2	5	8	3	12	2
X67	2	5	8	3	12	2
X67	2	4	6	3	12	1
X67	2	4	7	4	12	1
X67	2	9	7	2	12	2
X67	2	9	7	3	12	2
X67	2	6	7	4	12	2
X67	2	2	7	2	12	2
X67	2	6	7	2	12	2
X67	2	5	7	4	12	1
X67	2	10	7	3	10	1
X67	2	4	8	4	10	1
X67	2	10	8	4	10	2
X67	2	7	7	4	10	1
X67	2	8	7	4	10	1
X67	2	11	7	2	10	1
X67	2	7	7	3	10	2
X67	2	9	6	3	10	1
X67	2	9	7	4	10	1
X67	2	10	7	2	10	1
X67	2	5	8	3	10	1
X67	2	12	7	4	10	2
X67	2	10	7	2	10	1
X67	2	5	7	4	10	1
X67	2	14	7	3	10	1
X67	2	8	7	4	10	1
X67	2	10	7	4	10	2

TRATAMIENTO	TIEMPO	FLUJO	PH	SM	EDAD	SEXO
X67	3	14	7	3	12	1
X67	3	15	7	2	12	1
X67	3	7	6	3	12	2
X67	3	10	7	3	12	2
X67	3	4	8	3	12	1
X67	3	8	7	2	12	1
X67	3	11	7	2	12	1
X67	3	14	7	2	12	1
X67	3	8	6	2	12	1
X67	3	15	7	2	12	2
X67	3	8	7	2	12	2
X67	3	7	6	2	12	1
X67	3	5	7	3	12	1
X67	3	11	6	2	12	2
X67	3	10	7	3	12	2
X67	3	8	6	3	12	2
X67	3	4	8	2	12	2
X67	3	5	6	3	12	2
X67	3	5	6	3	12	1
X67	3	5	7	3	10	1
X67	3	4	8	3	10	1
X67	3	10	7	3	10	2
X67	3	6	7	3	10	1
X67	3	2	8	3	10	1
X67	3	5	6	2	10	1
X67	3	4	7	3	10	2
X67	3	7	7	3	10	1
X67	3	3	8	3	10	1
X67	3	5	8	3	10	1
X67	3	9	7	3	10	1
X67	3	13	7	2	10	2
X67	3	9	7	3	10	1
X67	3	2	8	3	10	1
X67	3	7	7	2	10	1
X67	3	7	4	2	10	1
X67	3	8	7	3	10	2

TRATAMIENTO	TIEMPO	FLUJO	PH	SM	EDAD	SEXO
C	1	17	6	4	10	1
C	1	10	7	4	10	1
C	1	5	6	4	10	2
C	1	14	6	4	10	2
C	1	15	7	3	10	1
C	1	5	6	3	10	1
C	1	15	7	3	10	1
C	1	15	6	3	10	2
C	1	14	7	3	10	1
C	1	12	6	3	10	1
C	1	13	6	3	10	2
C	1	5	6	4	10	2
C	1	5	6	4	12	1
C	1	15	6	3	12	1
C	1	10	7	3	12	1
C	1	12	6	3	12	1
C	1	12	7	4	12	1
C	1	3	7	3	12	2
C	1	10	7	2	12	2
C	1	17	7	4	12	2
C	1	14	7	3	12	1
C	1	12	7	4	12	2
C	1	14	7	3	12	2
C	1	15	7	3	12	1
C	1	14	7	4	12	2
C	1	15	6	4	12	2
C	1	10	7	4	12	1
C	1	15	7	3	12	2
C	1	15	7	3	12	1
C	1	10	7	3	12	1
C	1	7	7	3	12	2
C	1	1	6	3	12	1
C	1	10	6	4	12	2

TRATAMIENTO	TIEMPO	FLUJO	PH	SM	EDAD	SEXO
C	2	10	6	2	10	1
C	2	9	7	2	10	1
C	2	2	6	3	10	2
C	2	17	6	3	10	2
C	2	15	7	3	10	1
C	2	4	6	3	10	1
C	2	10	7	3	10	1
C	2	9	7	4	10	2
C	2	10	7	3	10	1
C	2	12	7	3	10	1
C	2	11	7	3	10	2
C	2	15	6	3	10	2
C	2	9	6	2	12	1
C	2	14	6	2	12	1
C	2	10	7	2	12	1
C	2	13	7	4	12	1
C	2	12	7	4	12	1
C	2	6	7	4	12	2
C	2	10	7	3	12	2
C	2	15	7	3	12	2
C	2	15	7	3	12	1
C	2	14	6	4	12	2
C	2	15	7	2	12	2
C	2	17	7	2	12	1
C	2	18	7	3	12	2
C	2	13	6	3	12	2
C	2	14	7	2	12	1
C	2	14	7	2	12	2
C	2	13	7	4	12	1
C	2	7	6	4	12	1
C	2	10	7	3	12	2
C	2	3	6	3	12	1
C	2	11	6	3	12	2

TRATAMIENTO	TIEMPO	FLUJO	PH	SM	EDAD	SEXO
C	3	12	8	2	10	1
C	3	10	7	2	10	1
C	3	4	4	3	10	2
C	3	17	7	1	10	2
C	3	10	6	3	10	1
C	3	10	6	3	10	1
C	3	17	7	2	10	1
C	3	10	6	3	10	2
C	3	11	8	3	10	1
C	3	14	8	3	10	1
C	3	6	6	3	10	2
C	3	10	7	4	10	2
C	3	10	6	2	12	1
C	3	18	7	2	12	1
C	3	15	8	3	12	1
C	3	10	6	3	12	1
C	3	12	8	3	12	1
C	3	7	7	3	12	2
C	3	10	7	3	12	2
C	3	17	8	3	12	2
C	3	10	7	3	12	1
C	3	10	6	3	12	2
C	3	15	7	3	12	2
C	3	15	8	3	12	1
C	3	17	7	3	12	2
C	3	10	6	3	12	2
C	3	11	8	2	12	1
C	3	11	7	4	12	2
C	3	12	7	3	12	1
C	3	5	5	3	12	1
C	3	7	5	2	12	2
C	3	5	6	3	12	1
C	3	8	6	3	12	2

OBSERVACIONES MUESTRALES UTILIZADAS

TRATAMIENTO	TIEMPO	FLUJO	PH	SM	EDAD	SEXO	Nº DATO
X30	1	16	4	2	6	1	1
X30	1	3	4	2	6	1	2
X30	1	3	5	3	6	1	3
X30	1	10	4	4	6	2	4
X30	1	2	5	4	6	1	5
X30	1	8	5	4	6	2	6
X30	1	6	7	4	6	1	7
X30	1	4	6	3	6	1	8
X30	1	4	4	3	6	1	9
X30	1	8	4	4	6	1	10
X30	1	7	4	4	6	1	11
X30	1	9	4	4	6	2	12
X30	1	10	5	4	6	2	13
X30	1	8	5	4	6	2	14
X30	1	4	4	2	6	2	15
X30	1	3	5	4	6	1	16
X30	1	7	4	2	6	2	17
X30	1	6	5	3	6	2	18
X30	1	10	4	4	6	1	19
X30	1	10	7	4	6	2	20
X30	1	6	6	3	6	2	21
X30	1	10	7	2	9	1	22
X30	1	13	6	4	9	2	23
X30	1	7	6	4	9	2	24
X30	1	5	8	4	9	2	25
X30	1	5	8	4	9	1	26
X30	1	11	8	3	9	1	27
X30	1	5	5	4	9	1	28
X30	1	3	7	4	9	1	29
X30	1	12	5	4	9	1	30
X30	1	4	7	4	9	2	31
X30	1	10	4	4	9	1	32
X30	1	13	5	4	9	1	33
X30	1	14	5	4	9	1	34
X30	1	20	5	4	9	2	35
X30	1	13	4	3	9	2	36
X30	1	6	5	2	9	2	37
X30	1	8	6	4	9	2	38
X30	1	7	7	4	9	2	39

TRATAMIENTO	TIEMPO	FLUJO	PH	SM	EDAD	SEXO	Nº DATO
X30	2	5	4	2	6	1	40
X30	2	8	4	3	6	1	41
X30	2	2	3	3	6	1	42
X30	2	10	4	3	6	2	43
X30	2	3	4	2	6	1	44
X30	2	10	5	2	6	2	45
X30	2	14	8	2	6	1	46
X30	2	3	6	3	6	1	47
X30	2	3	3	2	6	1	48
X30	2	13	5	3	6	1	49
X30	2	13	5	2	6	1	50
X30	2	8	5	2	6	2	51
X30	2	5	4	3	6	2	52
X30	2	8	6	2	6	2	53
X30	2	7	5	3	6	2	54
X30	2	10	5	2	6	1	55
X30	2	10	5	3	6	2	56
X30	2	10	7	2	6	2	57
X30	2	10	4	3	6	1	58
X30	2	14	5	3	6	2	59
X30	2	10	7	3	6	2	60
X30	2	12	7	2	9	1	61
X30	2	7	5	3	9	2	62
X30	2	10	5	3	9	2	63
X30	2	5	6	3	9	2	64
X30	2	3	7	3	9	1	65
X30	2	10	7	2	9	1	66
X30	2	5	5	4	9	1	67
X30	2	5	5	3	9	1	68
X30	2	8	5	3	9	1	69
X30	2	3	7	2	9	2	70
X30	2	6	6	3	9	1	71
X30	2	13	5	3	9	1	72
X30	2	15	7	3	9	1	73
X30	2	10	7	3	9	2	74
X30	2	8	6	2	9	2	75
X30	2	5	5	2	9	2	76
X30	2	10	6	2	9	2	77
X30	2	8	5	2	9	2	78

TRATAMIENTO	TIEMPO	FLUJO	PH	SM	EDAD	SEXO	Nº DATO
X30	3	8	4	1	6	1	79
X30	3	3	4	1	6	1	80
X30	3	2	5	2	6	1	81
X30	3	10	6	2	6	2	82
X30	3	2	6	2	6	1	83
X30	3	9	4	2	6	2	84
X30	3	12	5	2	6	1	85
X30	3	6	4	2	6	1	86
X30	3	2	4	2	6	1	87
X30	3	10	5	3	6	1	88
X30	3	11	4	2	6	1	89
X30	3	7	5	2	6	2	90
X30	3	5	4	2	6	2	91
X30	3	7	4	2	6	2	92
X30	3	9	5	2	6	2	93
X30	3	2	3	2	6	1	94
X30	3	15	5	2	6	2	95
X30	3	6	6	4	6	2	96
X30	3	10	5	3	6	1	97
X30	3	14	5	2	6	2	98
X30	3	9	7	3	6	2	99
X30	3	5	3	2	6	1	100
X30	3	1	9	2	9	2	101
X30	3	3	8	3	9	2	102
X30	3	1	9	3	9	2	103
X30	3	1	9	2	9	1	104
X30	3	2	8	3	9	1	105
X30	3	1	8	4	9	1	106
X30	3	1	7	3	9	1	107
X30	3	2	6	3	9	1	108
X30	3	4	7	2	9	2	109
X30	3	1	7	3	9	1	110
X30	3	5	7	2	9	1	111
X30	3	5	7	2	9	1	112
X30	3	5	8	2	9	2	113
X30	3	6	7	2	9	2	114
X30	3	2	8	2	9	2	115
X30	3	4	9	2	9	2	116
X30	3	2	8	2	9	2	117

TRATAMIENTO	TIEMPO	FLUJO	PH	SM	EDAD	SEXO	Nº DATO
X5	1	7	6	4	9	1	1
X5	1	11	6	3	9	2	2
X5	1	16	7	4	9	2	3
X5	1	6	7	3	9	2	4
X5	1	11	7	3	9	2	5
X5	1	8	5	4	9	2	6
X5	1	10	6	4	9	1	7
X5	1	8	6	4	9	1	8
X5	1	4	6	2	9	1	9
X5	1	7	5	3	9	1	10
X5	1	10	5	4	9	1	11
X5	1	6	6	3	9	1	12
X5	1	12	6	4	9	2	13
X5	1	6	6	4	9	2	14
X5	1	3	9	3	9	2	15
X5	1	12	6	3	6	1	16
X5	1	2	7	3	6	1	17
X5	1	13	6	3	6	1	18
X5	1	7	8	3	6	1	19
X5	1	8	5	3	6	1	20
X5	1	16	4	4	6	2	21
X5	1	11	6	4	6	1	22
X5	1	9	5	2	6	2	23
X5	1	12	6	3	6	2	24
X5	1	4	6	2	6	2	25
X5	1	8	4	3	6	1	26
X5	1	12	8	2	6	2	27
X5	1	19	6	3	6	2	28
X5	1	2	7	3	6	2	29
X5	1	4	7	2	6	2	30
X5	1	10	6	3	6	2	31
X5	1	16	6	3	6	2	32
X5	1	9	6	4	6	2	33
X5	1	10	6	4	6	2	34
X5	1	8	7	3	6	1	35
X5	1	13	6	4	6	1	36
X5	1	2	8	2	6	2	37

TRATAMIENTO	TIEMPO	FLUJO	PH	SM	EDAD	SEXO	Nº DATO
X5	2	10	7	3	9	1	38
X5	2	14	6	3	9	2	39
X5	2	20	8	2	9	2	40
X5	2	4	5	2	9	2	41
X5	2	15	7	3	9	2	42
X5	2	10	5	3	9	2	43
X5	2	13	5	2	9	1	44
X5	2	10	6	2	9	1	45
X5	2	4	6	2	9	1	46
X5	2	15	8	2	9	1	47
X5	2	15	7	2	9	1	48
X5	2	13	8	2	9	1	49
X5	2	20	6	3	9	2	50
X5	2	12	7	2	9	2	51
X5	2	7	7	3	9	2	52
X5	2	15	8	3	9	1	53
X5	2	2	8	2	6	1	54
X5	2	13	6	3	6	1	55
X5	2	5	7	2	6	1	56
X5	2	10	7	3	6	1	57
X5	2	20	8	2	6	2	58
X5	2	15	7	2	6	1	59
X5	2	10	7	2	6	2	60
X5	2	12	6	2	6	2	61
X5	2	7	5	2	6	2	62
X5	2	7	4	3	6	1	63
X5	2	15	7	2	6	2	64
X5	2	20	8	2	6	2	65
X5	2	2	5	3	6	2	66
X5	2	9	7	3	6	2	67
X5	2	10	6	3	6	2	68
X5	2	16	6	3	6	2	69
X5	2	12	5	3	6	2	70
X5	2	12	7	2	6	2	71
X5	2	15	8	2	6	1	72
X5	2	14	6	3	6	1	73
X5	2	1	7	2	6	2	74

TRATAMIENTO	TIEMPO	FLUJO	PH	SM	EDAD	SEXO	Nº DATO
X5	3	10	7	3	9	1	75
X5	3	10	7	3	9	2	76
X5	3	20	8	2	9	2	77
X5	3	1	8	2	9	2	78
X5	3	20	8	2	9	2	79
X5	3	10	5	2	9	2	80
X5	3	14	6	2	9	1	81
X5	3	5	6	2	9	1	82
X5	3	4	5	2	9	1	83
X5	3	15	8	2	9	1	84
X5	3	15	6	3	9	1	85
X5	3	14	6	3	9	1	86
X5	3	19	7	3	6	2	87
X5	3	12	5	3	6	2	88
X5	3	4	6	2	6	2	89
X5	3	15	6	3	6	1	90
X5	3	2	4	2	6	1	91
X5	3	5	6	2	6	1	92
X5	3	5	7	3	6	1	93
X5	3	10	6	3	6	1	94
X5	3	17	7	3	6	2	95
X5	3	16	6	2	6	1	96
X5	3	9	6	1	6	2	97
X5	3	10	6	2	6	2	98
X5	3	2	4	2	6	2	99
X5	3	7	4	2	6	1	100
X5	3	15	8	2	6	2	101
X5	3	20	6	3	6	2	102
X5	3	1	6	2	6	2	103
X5	3	6	6	2	6	2	104
X5	3	9	6	1	6	2	105
X5	3	10	6	1	6	2	106
X5	3	8	4	2	6	2	107
X5	3	9	6	2	6	2	108
X5	3	15	7	2	6	1	109
X5	3	20	7	2	6	1	110
X5	3	2	8	2	6	2	111

TRATAMIENTO	TIEMPO	FLUJO	PH	SM	EDAD	SEXO	Nº DATO
X67	1	9	8	3	12	1	1
X67	1	5	8	3	12	1	2
X67	1	5	8	3	12	2	3
X67	1	7	9	3	12	2	4
X67	1	3	8	3	12	1	5
X67	1	10	8	3	12	1	6
X67	1	6	7	2	12	1	7
X67	1	3	9	3	12	1	8
X67	1	7	8	3	12	1	9
X67	1	9	8	4	12	2	10
X67	1	5	8	4	12	2	11
X67	1	6	8	4	12	1	12
X67	1	5	7	4	12	1	13
X67	1	8	8	4	12	2	14
X67	1	10	8	3	12	2	15
X67	1	6	8	4	12	2	16
X67	1	8	8	3	12	2	17
X67	1	7	8	2	12	2	18
X67	1	2	8	3	12	1	19
X67	1	6	8	3	10	1	20
X67	1	3	8	3	10	1	21
X67	1	7	8	2	10	2	22
X67	1	4	7	4	10	1	23
X67	1	5	8	4	10	1	24
X67	1	7	8	3	10	1	25
X67	1	5	8	3	10	2	26
X67	1	5	7	3	10	1	27
X67	1	10	8	2	10	1	28
X67	1	9	8	4	10	1	29
X67	1	3	7	2	10	1	30
X67	1	7	8	4	10	2	31
X67	1	8	8	3	10	1	32
X67	1	4	8	3	10	1	33
X67	1	7	9	4	10	1	34
X67	1	10	8	3	10	1	35
X67	1	4	8	4	10	2	36

TRATAMIENTO	TIEMPO	FLUJO	PH	SM	EDAD	SEXO	Nº DATO
X67	2	10	8	3	12	1	37
X67	2	7	8	4	12	1	38
X67	2	7	8	3	12	2	39
X67	2	11	8	3	12	2	40
X67	2	4	8	4	12	1	41
X67	2	10	7	4	12	1	42
X67	2	9	7	2	12	1	43
X67	2	10	7	3	12	1	44
X67	2	7	7	2	12	1	45
X67	2	5	8	3	12	2	46
X67	2	5	8	3	12	2	47
X67	2	4	6	3	12	1	48
X67	2	4	7	4	12	1	49
X67	2	9	7	2	12	2	50
X67	2	9	7	3	12	2	51
X67	2	6	7	4	12	2	52
X67	2	2	7	2	12	2	53
X67	2	6	7	2	12	2	54
X67	2	5	7	4	12	1	55
X67	2	10	7	3	10	1	56
X67	2	4	8	4	10	1	57
X67	2	10	8	4	10	2	58
X67	2	7	7	4	10	1	59
X67	2	8	7	4	10	1	60
X67	2	11	7	2	10	1	61
X67	2	7	7	3	10	2	62
X67	2	9	6	3	10	1	63
X67	2	9	7	4	10	1	64
X67	2	10	7	2	10	1	65
X67	2	5	8	3	10	1	66
X67	2	12	7	4	10	2	67
X67	2	10	7	2	10	1	68
X67	2	5	7	4	10	1	69
X67	2	14	7	3	10	1	70
X67	2	8	7	4	10	1	71
X67	2	10	7	4	10	2	72

TRATAMIENTO	TIEMPO	FLUJO	PH	SM	EDAD	SEXO	Nº DATO
X67	3	14	7	3	12	1	73
X67	3	15	7	2	12	1	74
X67	3	7	6	3	12	2	75
X67	3	10	7	3	12	2	76
X67	3	4	8	3	12	1	77
X67	3	8	7	2	12	1	78
X67	3	11	7	2	12	1	79
X67	3	14	7	2	12	1	80
X67	3	8	6	2	12	1	81
X67	3	15	7	2	12	2	82
X67	3	8	7	2	12	2	83
X67	3	7	6	2	12	1	84
X67	3	5	7	3	12	1	85
X67	3	11	6	2	12	2	86
X67	3	10	7	3	12	2	87
X67	3	8	6	3	12	2	88
X67	3	4	8	2	12	2	89
X67	3	5	6	3	12	2	90
X67	3	5	6	3	12	1	91
X67	3	5	7	3	10	1	92
X67	3	4	8	3	10	1	93
X67	3	10	7	3	10	2	94
X67	3	6	7	3	10	1	95
X67	3	2	8	3	10	1	96
X67	3	5	6	2	10	1	97
X67	3	4	7	3	10	2	98
X67	3	7	7	3	10	1	99
X67	3	3	8	3	10	1	100
X67	3	5	8	3	10	1	101
X67	3	9	7	3	10	1	102
X67	3	13	7	2	10	2	103
X67	3	9	7	3	10	1	104
X67	3	2	8	3	10	1	105
X67	3	7	7	2	10	1	106
X67	3	7	4	2	10	1	107
X67	3	8	7	3	10	2	108

TRATAMIENTO	TIEMPO	FLUJO	PH	SM	EDAD	SEXO	Nº DATO
C	1	17	6	4	10	1	1
C	1	10	7	4	10	1	2
C	1	5	6	4	10	2	3
C	1	14	6	4	10	2	4
C	1	15	7	3	10	1	5
C	1	5	6	3	10	1	6
C	1	15	7	3	10	1	7
C	1	15	6	3	10	2	8
C	1	14	7	3	10	1	9
C	1	12	6	3	10	1	10
C	1	13	6	3	10	2	11
C	1	5	6	4	10	2	12
C	1	5	6	4	12	1	13
C	1	15	6	3	12	1	14
C	1	10	7	3	12	1	15
C	1	12	6	3	12	1	16
C	1	12	7	4	12	1	17
C	1	3	7	3	12	2	18
C	1	10	7	2	12	2	19
C	1	17	7	4	12	2	20
C	1	14	7	3	12	1	21
C	1	12	7	4	12	2	22
C	1	14	7	3	12	2	23
C	1	15	7	3	12	1	24
C	1	14	7	4	12	2	25
C	1	15	6	4	12	2	26
C	1	10	7	4	12	1	27
C	1	15	7	3	12	2	28
C	1	15	7	3	12	1	29
C	1	10	7	3	12	1	30
C	1	7	7	3	12	2	31
C	1	1	6	3	12	1	32
C	1	10	6	4	12	2	33

TRATAMIENTO	TIEMPO	FLUJO	PH	SM	EDAD	SEXO	Nº DATO
C	2	10	6	2	10	1	34
C	2	9	7	2	10	1	35
C	2	2	6	3	10	2	36
C	2	17	6	3	10	2	37
C	2	15	7	3	10	1	38
C	2	4	6	3	10	1	39
C	2	10	7	3	10	1	40
C	2	9	7	4	10	2	41
C	2	10	7	3	10	1	42
C	2	12	7	3	10	1	43
C	2	11	7	3	10	2	44
C	2	15	6	3	10	2	45
C	2	9	6	2	12	1	46
C	2	14	6	2	12	1	47
C	2	10	7	2	12	1	48
C	2	13	7	4	12	1	49
C	2	12	7	4	12	1	50
C	2	6	7	4	12	2	51
C	2	10	7	3	12	2	52
C	2	15	7	3	12	2	53
C	2	15	7	3	12	1	54
C	2	14	6	4	12	2	55
C	2	15	7	2	12	2	56
C	2	17	7	2	12	1	57
C	2	18	7	3	12	2	58
C	2	13	6	3	12	2	59
C	2	14	7	2	12	1	60
C	2	14	7	2	12	2	61
C	2	13	7	4	12	1	62
C	2	7	6	4	12	1	63
C	2	10	7	3	12	2	64
C	2	3	6	3	12	1	65
C	2	11	6	3	12	2	66

TRATAMIENTO	TIEMPO	FLUJO	PH	SM	EDAD	SEXO	Nº DATO
C	3	12	8	2	10	1	67
C	3	10	7	2	10	1	68
C	3	4	4	3	10	2	69
C	3	17	7	1	10	2	70
C	3	10	6	3	10	1	71
C	3	10	6	3	10	1	72
C	3	17	7	2	10	1	73
C	3	10	6	3	10	2	74
C	3	11	8	3	10	1	75
C	3	14	8	3	10	1	76
C	3	6	6	3	10	2	77
C	3	10	7	4	10	2	78
C	3	10	6	2	12	1	79
C	3	18	7	2	12	1	80
C	3	15	8	3	12	1	81
C	3	10	6	3	12	1	82
C	3	12	8	3	12	1	83
C	3	7	7	3	12	2	84
C	3	10	7	3	12	2	85
C	3	17	8	3	12	2	86
C	3	10	7	3	12	1	87
C	3	10	6	3	12	2	88
C	3	15	7	3	12	2	89
C	3	15	8	3	12	1	90
C	3	17	7	3	12	2	91
C	3	10	6	3	12	2	92
C	3	11	8	2	12	1	93
C	3	11	7	4	12	2	94
C	3	12	7	3	12	1	95
C	3	5	5	3	12	1	96
C	3	7	5	2	12	2	97
C	3	5	6	3	12	1	98
C	3	8	6	3	12	2	99