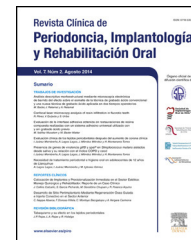




Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral

www.elsevier.es/piro



TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Período de *wash-out* en diseños experimentales cruzados con dentífrico de alta concentración de fluoruro



Constanza E. Fernández*, Livia M.A. Tenuta y Jaime A. Cury

Facultad de Odontología de Piracicaba, Universidad Estatal de Campinas, São Paulo, Brasil

Recibido el 4 de agosto de 2014; aceptado el 27 de diciembre de 2014

Disponible en Internet el 18 de febrero de 2015

PALABRAS CLAVE

Saliva;
Fluoruro;
Dentífrico

Resumen

Objetivo: La mayoría de los estudios cruzados con dentífrico fluoretado (DF) de concentración estándar (1.000-1.500 ppm F) han empíricamente utilizado un periodo de *wash-out* de 7 días para eliminar el efecto residual del tratamiento. Para DF de alta concentración (5.000 ppm F) este periodo es desconocido y sería necesario un tiempo mayor para la remoción de fluoruro (F) de la saliva. Este estudio verificó si menos de 7 días sería suficiente para eliminar el F residual de la saliva después de uso DF de 5.000 ppm F.

Metodología: Estudio *in vivo*, análisis ciego, donde voluntarios (n=6) cepillaron sus dientes 3 veces por día en la secuencia: a) periodo inicial o *lead-in* de 3 días con uso de dentífrico placebo de fluoruro (DP) (0 ppm F); b) uso de DF de alta concentración (5.000 ppm F) por 4 días; y c) *wash-out* con uso de DP por 3 días. Durante los 3 periodos, saliva estimulada y no estimulada fue colectada en ayuno (después del periodo *overnight* del último cepillado). La concentración de F en la saliva fue evaluada utilizando electrodo específico.

Resultados: El F en la saliva después de suspendido el uso de DF (periodo de *wash-out*) fue similar a los valores basales. Concentraciones de F no presentaron diferencias entre saliva estimulada y no estimulada.

Conclusión: Dos días de *wash-out* con dentífrico no fluorado fueron suficientes para eliminar F residual en la saliva después de haber utilizado dentífrico de alta concentración. Estos resultados son válidos también para dentífrico de concentración estándar.

© 2014 Sociedad de Periodoncia de Chile, Sociedad de Implantología Oral de Chile y Sociedad de Prótesis y Rehabilitación Oral de Chile. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: cfernandez.go@gmail.com (C.E. Fernández).

KEYWORDS

Saliva;
Fluoride;
Dentifrice;
Toothpaste

Wash-out period for crossover design experiments using high fluoride concentration dentifrice**Abstract**

Objective: Most crossover studies using fluoride dentifrice (FD) of standard concentration (1000-1500 ppm F) have empirically used a wash-out period of 7 days to remove the residual effect of the treatment. For higher concentrations of FD (5000 ppm F) the period is unknown, and a longer time may be required to remove fluoride (F) from saliva. Therefore, the aim of the study was to determine if less than 7 days of wash-out would be sufficient to remove residual F in saliva after using 5000 ppm F FD.

Methodology: An in vivo study, blind analysis, was conducted on volunteers (n = 6) who brushed their teeth 3 times per day in the following sequence: a) initial or lead-in period of 3 days using placebo fluoride dentifrice (PD) (0 ppm F); b) using a high concentration FD (5000 ppm F) for 4 days; and c) wash-out using PD for 3 days. During the 3 periods, samples of non-stimulated and stimulated saliva were collected after fasting (one overnight period from the last brushing). Fluoride concentration was assessed in saliva using a fluoride specific electrode.

Results: F concentrations in saliva after discontinued use of FD (wash-out period of 2 and 3 days) were similar to baseline values. F concentrations did not differ between unstimulated and stimulated saliva.

Conclusion: A two day wash-out period using non-fluoridated dentifrice was sufficient to eliminate residual F in saliva after use of a high concentration F dentifrice. These results are also valid for standard concentrations of dentifrice.

© 2014 Sociedad de Periodoncia de Chile, Sociedad de Implantología Oral de Chile y Sociedad de Prótesis y Rehabilitación Oral de Chile. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

El diseño experimental cruzado (*crossover design*) es ampliamente utilizado en muchas áreas de la ciencia, incluyendo investigaciones en odontología¹, tanto para estudios *in situ*² o *in vivo*. En este diseño cada sujeto sirve como su propio control¹, pues él pasa por todos los tratamientos experimentales que están siendo estudiados durante fases diferentes (fig. 1). Su gran ventaja es la reducción de la alta variabilidad naturalmente presente en estudios que involucran humanos. Sin embargo, con el objetivo de no interferir en el tratamiento siguiente (efecto de carga, o *carry-over*) es importante obedecer un periodo suficiente de tiempo conocido como *wash-out* entre las fases experimentales, lo que asegura la eliminación (*clearance*) del tratamiento previo¹⁻³.

Dependiendo del propósito del estudio y lo que está siendo evaluado específicamente, la duración de este periodo puede ser variable. De esta forma, estudios que evalúan productos con efecto antibacteriano, como la clorhexidina, que tiene una alta sustantividad, requieren un mayor periodo de *wash-out*, se ha sugerido 10 días⁴. Investigaciones en las cuales se estudian cambios en la microbiota, por ejemplo la inoculación de las bacterias probióticas, se sugiere que el periodo de *wash-out* sea de 14 días⁵ para una total eliminación de la cavidad oral. Específicamente para el uso de dentífrico fluorado de concentración convencional (1.000-1.500 ppm F)⁶⁻⁸ o de alta concentración (5.000 ppm F)⁹ la mayoría de los estudios han usado 7 días periodo de *wash-out*, pero sin una justificación clara de la necesidad de ese tiempo.

Estudios han estimado que el F proveniente de cepillado con dentífrico de hasta 2.500 ppm F sería removido de la saliva en un corto periodo de tiempo (40-80 min)^{10,11}, siendo 7 días un periodo de *wash-out* probablemente innecesario. No obstante, en el caso de dentífrico de alta concentración de F (5000 ppm F) el tiempo necesario para la eliminación de efecto residual es desconocido, y sería más crítico para la posible formación de productos de reacción en las superficies de los dientes o acumulación en las superficies mucosas. Por lo tanto, fue realizado un estudio *in vivo* para estimar si menos de 7 días sería suficiente para eliminar el F residual en la saliva después del uso de dentífrico de alta concentración de F.

Materiales y métodos**Diseño experimental**

Fue ejecutado un estudio *in vivo*, con análisis ciego, en el que 6 voluntarios se cepillaron sus dientes 3 veces al día (después de las comidas principales con una cantidad aproximada de 1 g de dentífrico) utilizando solamente el dentífrico proporcionado por los investigadores de acuerdo al diagrama anexo (fig. 2). Los voluntarios participantes fueron estudiantes de posgrado, con una edad media de 26,5 ± 1,9 años. El estudio contempló 3 fases: a) periodo inicial o *lead-in* de 3 días con uso de dentífrico de placebo (DP) (0 ppm F); b) uso de DF de alta concentración de F (5.000 ppm F, base NaF y sílice como abrasivo) por 4 días; y c) *wash-out* con uso de DP por 3 días. Durante los 3 periodos muestras de saliva estimulada y no estimulada fueran colectadas en días fijados.

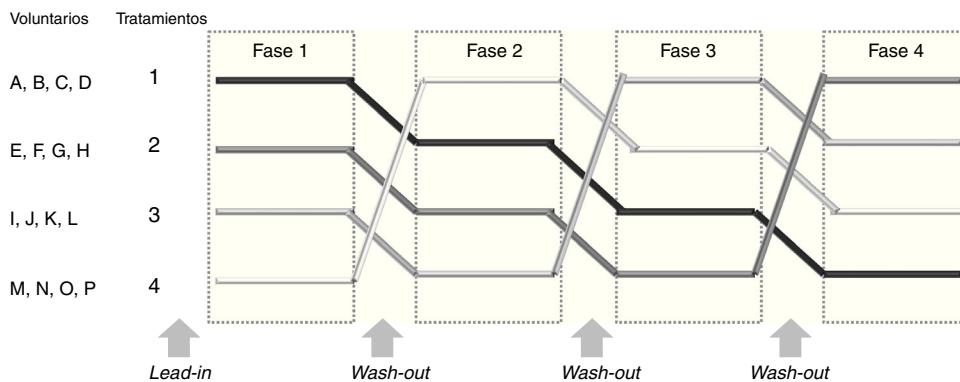


Figura 1 Esquema representativo de un estudio cruzado.

Este estudio fue parte de un estudio principal que cuenta con aprobación del Comité de ética de la Facultad de Odontología de Piracicaba/UNICAMP, protocolo n.º 108/2011.

Colecta de saliva

Las colectas de saliva fueron realizadas en horario estandarizado, entre las 8-10 a.m., con los voluntarios en ayuno, sin haber cepillado sus dientes desde la noche anterior (*overnight*). De esta forma las colectas fueron realizadas por la mañana en los días indicados en la figura 2. Tanto saliva estimulada como no estimulada fue obtenida de los voluntarios, de modo que se pueden observar posibles diferencias en la concentración de F entre los 2 tipos de flujos salivares.

Inicialmente fue colectada saliva no estimulada durante 5 min. Esta colecta fue realizada con el voluntario en posición sentada y con indicación de no hablar durante el tiempo de colecta. Inmediatamente fue colectada la saliva estimulada masticando Parafilm®. La saliva producida durante los primeros 30seg fue deglutida y luego toda la saliva producida durante 3min fue colectada en un recipiente de plástico. El peso obtenido fue registrado, y considerando que el 99% de la saliva es agua (densidad 1,0g/ml), los valores fueron transformados a ml. Utilizando el tiempo de cada colecta fue calculado el flujo salivar (ml/min).

Análisis de fluoruro en la saliva

La saliva colectada fue centrifugada a 3.500g para separar materia en suspensión (bacterias, células descamadas). El sobrenadante fue almacenado a -20°C y luego las muestras

codificadas fueron analizadas ciegamente al final del experimento para determinar la concentración de F. Las muestras descongeladas fueron tamponadas con TISAB III (1:10, v/v), agitadas y analizadas con electrodo ión-específico (Orion model 96-09, Orion Research, Cambridge, MA, EE. UU.) acoplado a analizador de iones (Orion EA-940). El electrodo fue previamente calibrado con estándares de 0,031 a 2,0 µg F/ml, también tamponados con TISAB III (1:10, v/v) y leídos en triplicado. Una regresión lineal entre concentración de fluoruro F y mV permitió determinar la concentración de F en las muestras. El promedio de la concentración de F entre los voluntarios (n = 6) (± desviación estándar [DE]) de cada día fue calculada y expresada como ppm F (µg F/ml).

Análisis de datos

Distribución normal y homocedasticidad de los datos de concentración de F fue examinada utilizando la prueba Shapiro-Wilk. Debido a la distribución de los datos fueron utilizadas pruebas no paramétricas. Fue utilizado el test de Friedman para comparar la concentración de fluoruro en la saliva entre las diferentes fases (análisis pareado). La comparación entre flujo de la saliva estimulada y no estimulada en cada fase fue realizada utilizando la prueba U de Mann Whitney. Los datos fueron analizados empleando el software estadístico SPSS 22.0, con un 5% de nivel de significación.

Resultados

El flujo salivar de los voluntarios fue $0,49 \pm 0,23$ ml/min (promedio ± DE) para saliva no estimulada y $1,56 \pm 0,45$ para

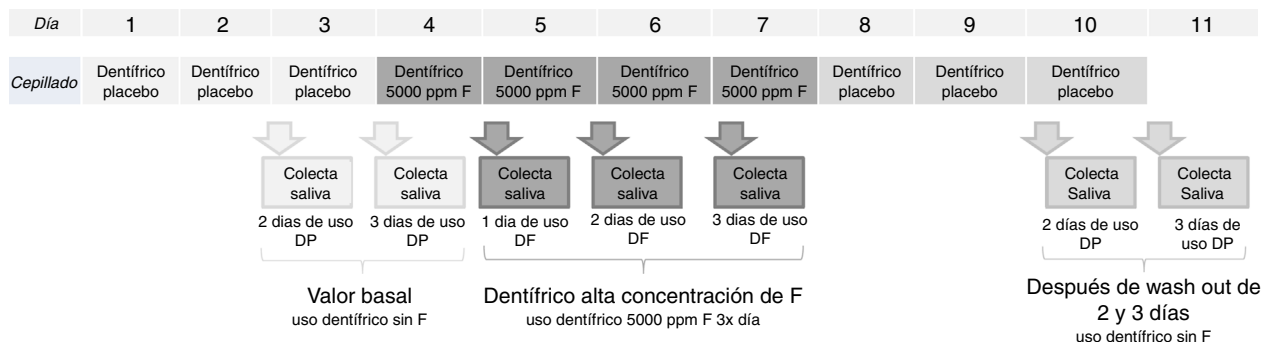


Figura 2 Flujoograma del experimento.

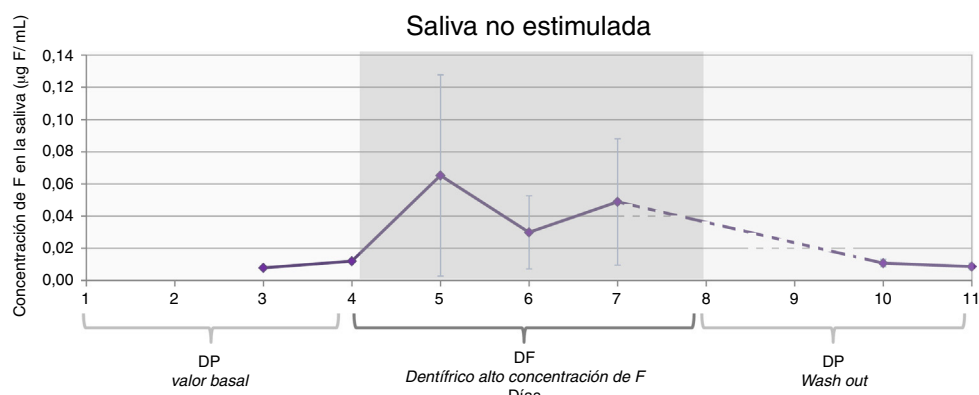


Figura 3 Concentración de fluoruro ($\mu\text{g F/ml}$) en la saliva no estimulada en función del tipo de dentífrico utilizado en los diferentes días de colecta.

DF: 5.000 ppm F; DP: placebo.

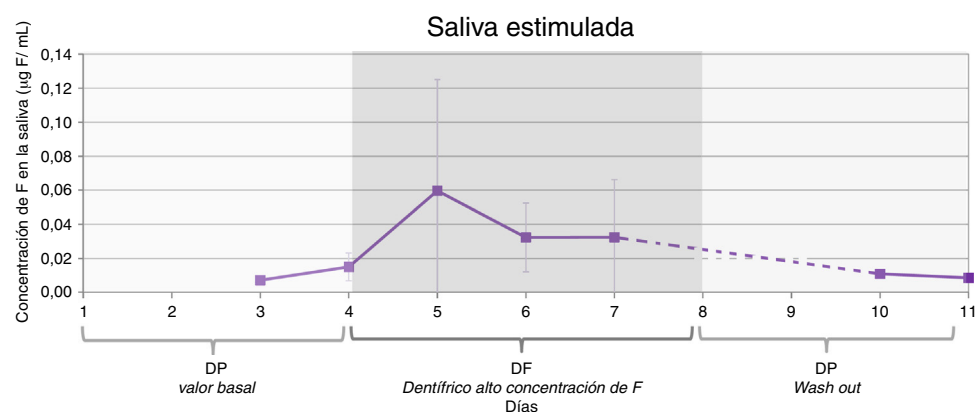


Figura 4 Concentración de fluoruro ($\mu\text{g F/ml}$) en la saliva estimulada en función del tipo de dentífrico utilizado en los diferentes días de colecta.

DF: 5.000 ppm F; DP: placebo.

saliva estimulada. Los resultados del análisis de F en la saliva están presentados en las figuras 3 y 4. El uso de DF de 5.000 ppm F consiguió mantener niveles de F detectables en la saliva no estimulada y estimulada ($0,048 \pm 0,018$ y $0,041 \pm 0,016$ ppm F) después del periodo *over-night*. Los valores de F en la saliva durante esta fase fueron superiores que en las fases basal y de *wash-out* ($p < 0,001$). El periodo de *wash-out* inicial o *lead in* arrojó los valores basales de concentración de F en la saliva no estimulada y estimulada ($0,010 \pm 0,003$ y $0,011 \pm 0,006$ ppm F), que fueron alcanzados después de 2 días de suspendido el uso de DF ($0,010 \pm 0,001$ and $0,010 \pm 0,002$ ppm F), no presentando diferencias estadísticas entre estas 2 fases ($p > 0,05$). Las concentraciones de F no presentaron diferencias entre saliva estimulada y no estimulada ($p > 0,05$) (figs. 3 y 4).

Discusión

El *clearance* salivar permite la remoción de varias sustancias de la cavidad bucal^{12,13}, incluyendo sustancias que desearíamos mantener para beneficiarnos de sus efectos positivos, como es el fluoruro (F) para el control de la caries dental. El *clearance* se ve afectado por alteraciones en el flujo

salivar, como sucedería en un paciente con hiposalivación^{12,13}. En nuestro estudio investigamos la remoción de F residual en saliva después de uso de DF de alta concentración de F, utilizando voluntarios con flujo salivar normal (mayor que 0,2 ml/min para saliva no estimulada y mayor que 1,0 ml/min para saliva estimulada), por lo tanto estos datos no podrían ser extrapolados para pacientes con flujo salivar reducido.

Los valores de F en la saliva durante los periodos de utilización de dentífrico placebo (0 ppm F) reflejarían el F proveniente del consumo de agua fluorada o del consumo de los alimentos preparados con agua fluorada. Los voluntarios participantes de este estudio consumieron agua fluorada (0,7 ppm F) durante el experimento por vivir en una región con óptima fluoración del agua de abastecimiento público (Piracicaba, SP, Brasil). La razón por la cual F es detectable en la saliva, se debe a que el mecanismo por el cual el agua potable mantiene niveles de fluoruro en la cavidad bucal proviene de la reabsorción de F que va a la sangre y luego subsecuentemente será secretado por las glándulas salivales¹⁴.

Realizamos colecta de ambos tipos de saliva para saber si podría ser usada una u otra, buscando la existencia de

variaciones en la concentración de F entre saliva estimulada y no estimulada. Los resultados no mostraron diferencia en la concentración con el aumento del flujo salivar mediante masticación. Esta similitud de las concentraciones puede ser debido a 2 posibles razones. La primera y la más simple explicación sería que la concentración del F no fue afectada por el flujo salivar, es decir, no estaría siendo diluido cuando aumenta la producción de saliva, como acontece con otros componentes salivares¹⁵. Sin embargo, la concentración puede ser levemente mayor en saliva no estimulada¹⁶. La segunda posibilidad es que la masticación del parafilm produjo liberación de F desde los tejidos blandos o proveniente del biofilm acumulado que aumentó la concentración en la saliva, sin embargo como simultáneamente el flujo está siendo aumentado, la concentración de F evaluada en la saliva final fue mantenida constante.

Durante el periodo de utilización de DF de 5.000 ppm F aún fue posible detectar F en la saliva a la mañana siguiente, pues las colectas de saliva fueron programadas 10-12 h después del cepillado nocturno. La presencia de ese F residual en la saliva puede ser explicado por la reducción del flujo salivar que naturalmente ocurre durante el periodo nocturno, debido a que la producción de saliva sigue un ritmo circadiano^{12,13}. Por lo tanto el clearance salivar sería menor si lo comparamos con una determinación después de 10-12 h durante un periodo diurno; no obstante, nuestro objetivo fue precisamente observar F presente en la saliva después del periodo nocturno.

Complementario a la reducción de flujo salivar durante la noche, es predecible que residuos de F permanecieron en los tejidos blandos de la cavidad oral o que ese F proviene de depósitos de F en la superficie de los dientes. Estos residuos de F o depósitos podrían estar siendo liberados aun 12 h después del cepillado. Variaciones en el comportamiento de los voluntarios, como la duración del cepillado y el enjuague después del cepillado, han mostrado efecto en la concentración de F salivar cuando se ha analizado el *clearance* salivar¹⁷. En el estudio citado fue evaluada la concentración de F salivar inmediatamente al finalizar el cepillado y hasta 2 h después, mostrando que un uso de mayor concentración, mayor cantidad de pasta, mayor tiempo de cepillado y enjuague con menor volumen de agua favorecen la retención de F en la saliva. Nuestro experimento no controló estas variables para aproximarse al comportamiento real de los voluntarios, lo que podría explicar la variación de la concentración salivar de F evaluada 10-12 h después del cepillado. Sin embargo, los valores después de 2 días de suspendido el uso de dentífrico fluorado mostraron que todos los voluntarios volvieron a los valores de F basal en la saliva, siendo el comportamiento de los voluntarios aparentemente no determinantes en esta evaluación. Para clarificar estos cuestionamientos nuevos estudios son necesarios, incluyendo la identificación de la cinética del F después de uso de DF de 5.000 ppm. Este experimento correspondió a un estudio piloto, lo que justifica el bajo número de participantes, no en tanto tuvo poder estadístico suficiente para observar diferencias y cumplir con nuestro objetivo.

En función de nuestros resultados podemos concluir que 2 días de *wash-out* son suficientes para eliminar restos de F de la saliva después de utilizado dentífrico de alta concentración.

Financiación

La primera autora recibió Beca BECAS CHILE/CONICYT durante su doctorado, Res.1166/2011.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Agradecimientos

A los voluntarios por su valiosa participación. A G. Montenegro por su asesoramiento estadístico. Este estudio está basado en datos de la tesis doctoral de la primera autora (Programa de posgrado en Odontología, mención Cariología, Facultad de Odontología de Piracicaba, Universidad Estatal de Campinas, UNICAMP, Brasil).

Bibliografía

1. Brunette DM. *Critical thinking: Understanding and evaluating dental research*. Chicago: Quistessence Publishing; 1996.
2. Zero DT. In situ caries models. *Adv Dent Res*. 1995;9:214-30.
3. Addy M, Moran JM. Evaluation of oral hygiene products: Science is true; don't be misled by the facts. *Periodontol* 2000. 1997;15:40-51.
4. Newcombe RG, Addy M, McKeown S. Residual effect of chlorhexidine gluconate in 4-day plaque regrowth crossover trials, and its implications for study design. *J Periodontal Res*. 1995;30:319-24.
5. Caglar E, Kuscü OO, Cildir SK, Kuvvetli SS, Sandalli N. A probiotic lozenge administered medical device and its effect on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Int J Paediatr Dent*. 2008;18:35-9.
6. Sjögren K, Lundberg AB, Birkhed D, Dudgeon DJ, Johnson MR. Interproximal plaque mass and fluoride retention after brushing and flossing—a comparative study of poweredtoothbrushing, manual toothbrushing and flossing. *Oral Health Prev Dent*. 2004;2:119-24.
7. Cury JA, do Amaral RC, Tenuta LM, del Bel Cury AA, Tabchoury CP. Low-fluoride toothpaste and deciduous enamel demineralization under biofilm accumulation and sucroseexposure. *Eur J Oral Sci*. 2010;118:370-5.
8. Kusano SC, Tenuta LM, Cury AA, Cury JA. Timing of fluoride toothpaste use and enamel-dentin demineralization. *Braz Oral Res*. 2011;25:383-7.
9. Amaechi BT, Ramalingam K, Mensinkai PK, Chedjieu I. In situ remineralization of early caries by a new high-fluoride dentifrice. *Gen Dent*. 2012;60:e186-92.
10. Duckworth RM, Morgan SN, Gilbert RJ. Oral fluoride measurements for estimation of the anti-caries efficacy of fluoride treatments. *J Dent Res*. 1992;71:836-40.
11. Serra MC, Cury JA. Cinética do Flúor na saliva após o uso de dentífrico e bochecho fluoretado. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 1992;46:875-8.
12. Dawes C. Fatores que influem na velocidade do fluxo e na composição da saliva. En: Edgar M, Dawes C, O'Mullane D, editores. *Saliva e saúde bucal*. São Paulo: Santos; 2010. p. 32-48.
13. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*. 2001;85:162-9.

14. Cury JA, Tenuta LM. How to maintain a cariostatic fluoride concentration in the oral environment. *Adv Dent Res.* 2008;20:13–6.
15. Bardow A, Lagerlöf F, Nauntofte B, Tenovou J. The role of saliva. En: Fejerskov O, Kidd E, editores. *Dental caries: The disease and its clinical management.* Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008. p. 190–207.
16. Shannon IL, Feller RP, Chauncey HH. Fluoride in human parotid saliva. *J Dent Res.* 1976;55:506–9.
17. Creeth J, Zero D, Mau M. The effect of dentifrice quantity and toothbrushing behaviour on oral delivery and retention of fluoride in vivo. *Int Dent J.* 2013;63 Suppl 2: 14–24.