

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Programa de Doctorado de Farmacia

Diseño, Desarrollo y Estudio de una fórmula Mucoadhesiva para
su aplicación en Defectos Periodontales "Black Holes"

TESIS DOCTORAL

Gabriella Russo

Granada

2020

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Gabriella Russo
ISBN: 978-84-1306-672-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/63972>

Este trabajo de tesis ha sido realizado en el **Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica** y en colaboración y coordinación con el **Departamento de Estomatología** de la **Facultad de Odontología**.

"Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado, un esfuerzo total es una victoria completa"

Mohatma Gandhi

"Sé firme en tus actitudes y perseverante en tu ideal. Pero sé paciente, no pretendiendo que todo te llegue de inmediato. Haz tiempo para todo, y todo lo que es tuyo, vendrá en tus manos en el momento oportuno"

Mohatma Gandhi

A mi familia

Mi hija Gabriella, Mi padres AnnaMaria e Procolo Massimo y mi mi marido Santi.

AGRADECIMIENTOS

Estoy muy agradecida por poder escribir este epígrafe y dedicar estas páginas a todas aquellas personas que han tenido un papel importante en este proyecto.

En primer lugar, quiero agradecer de manera especial y sincera a la Dra. María Adolfinia Ruiz Martínez y a la Dra. Elena Sánchez Fernández, mis directoras de tesis.

Gracias Adolfinia, has sido mi guía desde el primer momento. Hace 8 años llegué al Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica con mi español italianizado, y me acogiste desde el principio siendo mi tutora de Máster, orientándome en cada etapa de formación que decidí emprender en Granada, hasta llegar al día de hoy. Gracias por enseñarme tanto, por apoyarme y por estar siempre ayudándome a seguir adelante.

Gracias Elena por tu cariño, tu paciencia, por dedicarme tu tiempo y conocimiento, y por haberme permitido descubrir el mundo de la Odontología, una disciplina totalmente nueva para mí como farmacéutica.

Gracias a las dos, sin vosotras este trabajo no hubiera sido posible.

También quiero agradecer a la Doctora Herminia Castán Urbano. Gracias Herminia por tu colaboración y ayuda.

Gracias a Inves Biofarm por haberme brindado la oportunidad de gestionar este proyecto y haber confiado en mí todos estos años, así como ofrecerme todos los medios para la realización de esta tesis doctoral.

Gracias a mi compañera y amiga Almudena por escucharme siempre y ofrecerme tu ayuda cuando la necesitaba.

Gracias a Dani por tu apoyo "tecnológico" y cooperación desinteresada y generosa.

Gracias a Ramón Gutierrez por la gran labor de estadística.

A Bethany, gracias por acompañarme durante todos estos años siendo siempre tan motivadora.

A María y Valle por estar siempre a mi lado

A mi hija Gabriella, que con solo unos años ya me has enseñado muchas sabias lecciones de vida. Gracias por transmitirme tu alegría cada día. Gracias por ser mi fuente de energía, mi catalizador. Has sido mi motivación más grande para concluir con éxito este trabajo.

Quiero dar las gracias a mi marido Santi, por entenderme, por tu paciencia y tu cariño. Por poner todos los recursos necesarios a mi disposición para que pudiera llevar a cabo este proyecto.

Alla mia famiglia, le mie sorelle Antonella e Tania, mio fratello Alessandro, a mia nonna, nipoti, grazie per essere lí con me.

Ai miei genitori per avermi cresciuto e educato per essere la persona che sono oggi. Per la vostra tenacia, pazienza e spirito di sacrificio nell'avermi lasciato libera di scegliere, di partire e realizzare i miei progetti. Grazie per essere stati al mio fianco e appoggiarmi nelle mie decisioni.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	20
1.1.	ANATOMÍA DEL PERIODONTO	21
1.1.1.	Origen del periodonto	21
1.1.2.	Periodonto de protección	22
1.1.3.	Periodonto de inserción	24
1.1.3.1.	Cemento	25
1.1.3.2.	Ligamento Periodontal.....	26
1.1.3.3.	Hueso alveolar	27
1.1.4.	Mucosa bucal	28
1.2.	INTRODUCCIÓN A LAS ENFERMEDADES PERIODONTALES	30
1.2.1.	Clasificación de la periodontitis.....	32
1.2.1.1.	Condiciones mucogingivales	35
1.2.1.2.	Traumatismo oclusal y fuerzas oclusales traumáticas	35
1.2.1.3.	Factores relacionados con prótesis dentales y dientes	35
1.2.1.4.	Periimplantitis	37
1.2.1.5.	Diagnosis	38
1.3.	TRATAMIENTO HASTA LA ACTUALIDAD.....	42
1.3.1.	Antisépticos	42
1.3.2.	Antibacterianos	42
1.3.3.	Analgésicos y antiinflamatorios.....	43
1.3.4.	Terapia periodontal regenerativa	43
1.3.5.	Bio-modificación de la superficie de la raíz del diente.....	44
1.4.	ÁCIDO HIALURÓNICO	45
1.4.1.	Síntesis del ácido hialurónico	47
1.4.2.	Degradación del ácido hialurónico	47
1.5.	FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO.....	49
1.5.1.	Historia del EGF	49
1.5.2.	Propiedades del EGF	50
1.5.3.	Mecanismo de acción del EGF	51
1.5.4.	Aplicaciones del EGF	53
1.5.5.	EGF en tejidos periodontales	54
1.6.	ELETROPORACIÓN	57

1.7.	FORMULACIONES TÓPICAS.....	62
1.7.1.	Formulación bucal localizada.....	63
1.7.2.	Mucosas: aspectos generales a tener en cuenta para formular.....	63
1.7.3.	Mucoadhesión.....	64
1.7.4.	Formulaciones de administración bucal, sublingual y gingival.....	66
1.7.5.	Polímeros mucoadhesivos: aspectos generales.....	68
2.	HIPOTESIS.....	70
3.	OBJETIVOS.....	73
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	76
4.1.	MATERIALES.....	77
4.2.	MÉTODOS.....	77
4.2.1.	Determinación pH:.....	77
4.2.2.	Determinación de la Viscosidad.....	77
4.2.3.	Determinación de la estabilidad mediante el empleo de centrifugación.....	78
4.2.4.	Prueba de Extensibilidad.....	78
4.2.5.	Estudio de liberación/permeación con Células de Franz.....	78
4.2.6.	Espectrofotometría UV-Visible.....	80
4.2.7.	Constantes microbiológicas relevantes.....	81
4.2.8.	Estabilidad de la formulación.....	83
4.3.	DESARROLLO GALENICO.....	86
4.3.1.	Preparación de las formulaciones.....	92
4.3.1.1.	Emulsión.....	94
4.3.1.2.	Emulsión Liposomada.....	96
4.3.1.3.	Hidrogel.....	97
4.3.2.	Ensayo de la actividad "in vitro".....	97
4.4.	ESTUDIO CLÍNICO PILOTO.....	99
4.4.1.	METODOLOGÍA.....	99
4.4.1.1.	Diseño del estudio.....	99
4.4.1.2.	Duración del estudio.....	99
4.4.1.3.	Población de Referencia y Población de Estudio.....	99
4.4.1.4.	Criterios de inclusión y exclusión.....	100
4.4.1.5.	Tamaño Muestral.....	100

4.4.1.6. Variables	100
4.4.1.7. Definición del procedimiento	102
4.4.1.8. Plan de trabajo.....	102
4.4.1.9. Ética	103
4.4.1.10. Aplicación del producto mediante eletroporación	104
4.4.1.11. Análisis de datos	106
4.4.1.12. Dificultades y Limitaciones del estudio.....	106
4.4.1.13. Seguridad	107
4.4.1.14. Plan de difusión.....	107
4.4.1.15. Utilidad y aplicabilidad.....	107
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	109
5.1. Propiedades Organolépticas de las formulaciones.....	110
5.2. Prueba de Centrifugación.....	111
5.3. Determinación de pH	112
5.4. Determinación de Viscosidad	113
5.5. Determinación de Extensibilidad.....	114
5.6. Estudio de estabilidad previa	115
5.6.1. Estudio de estabilidad previa Emulsión.....	116
5.6.2. Estudio de estabilidad previa Hidrogel	118
5.6.3. Estudio de Estabilidad Corto Plazo Hidrogel	119
5.6.4. Estudios de Estabilidad Corto Plazo Emulsión.....	120
5.6.5. Estabilidad Largo Plazo Emulsión.....	121
5.7. Valoración del factor de crecimiento epidérmico	122
5.8. Estudio de Cesión/Permeación con Células de Franz.....	125
5.9. Estudio <i>in vitro</i> utilizando cultivos celulares.....	129
5.10. Estudio Microbiológico	130
5.11. Resultados y discusión estudio clínico	133
5.11.1. Estadísticas.....	133
6. CONCLUSIONES	141
7. BIBLIOGRAFIA	145
8. ANEXOS	157

Anexo 1 Hoja consentimiento informado	158
Anexo 2 Hoja información al paciente	159
Anexo 3 Hoja cuestionario recogida de datos	164
Anexo 4 Tablas estadísticas.....	169
Anexo 5 Comité ético.....	181

Índice Tablas

Tabla 1. Determinantes de la salud periodontal clínica.....	32
Tabla 2. Clasificación de la periodontitis 2017 Imagen modificada de (11).....	33
Tabla 3. Enfermedades sistémicas y periodontitis Imagen modificada de (11)	34
Tabla 4. Clasificación de periodontitis según workshop 2018 (11)	37
Tabla 5. Superficies y características zona bucal (88)	65
Tabla 6. Diluciones madre a preparar para los ensayos microbiológicos. Recuento total de microorganismos aerobios (TAMC) y recuento total combinado de hongos filamentosos y levaduras (TYMC) mediante técnica de recuento en superficie	82
Tabla 7. Condiciones de almacenamiento de las muestras en los dos tipos de estabilidad.....	85
Tabla 8. Composición de las formulaciones	92
Tabla 9. Formulación para Emulsión	95
Tabla 10. Formulación para Emulsión Liposomada con EGF en las dos formas de presentación	96
Tabla 11. Formulación para Hidrogel	97
Tabla 12. pH de las formulaciones	112
Tabla 13. Viscosidades, de las tres formulaciones	114
Tabla 14. Ensayo de Extensibilidad – Comparación entre formulaciones	114
Tabla 15. Ensayos de estabilidad previa Emulsión	117
Tabla 16. Ensayos de estabilidad previa Hidrogel	118
Tabla 17. Estudio de estabilidad a corto plazo Hidrogel.....	120
Tabla 18. Estabilidad a corto plazo Emulsión.....	121
Tabla 19. Estabilidad largo plazo Emulsión.....	122
Tabla 20. Valores de absorbancia para las concentraciones de proteína.....	124
Tabla 21. Concentraciones de EGF en los ensayos de cesión y permeación	126
Tabla 22. Número de células encontrado en las tres formulaciones y el valor promedio en cada caso.....	129
Tabla 23. Frecuencias descriptivas de las variables	134
Tabla 24. Resultados variables cambios después de 3 y 6 meses	136

Índice Figuras

Figura 1. Periodonto durante la erupción dental (1).....	21
Figura 2. Estructura encía (1)	22
Figura 3. Límites de la encía (www.clinicaperiodonica.cl).....	22
Figura 4. Diferentes tipos de fibras del periodonto de protección (4).....	24
Figura 5. Se observa la relación del cemento, el ligamento periodontal y el hueso alveolar formando la articulación alveolo-dentinal. Imagen modificada de (4).....	25
Figura 6. A) Fibras apicales; B) Espacio periapical de Black, C)Fibras de la cresta alveolar; G) Fibras gingivales; T) Fibras transeptales; H) Fibras horizontales, O) Fibras oblicuas Imagen modificada de (6)	26
Figura 7. Encía sana y enferma Imagen tomada de (36)	38
Figura 8. Estructura general de la unidad dimérica del ácido hialurónico en la.....	46
Figura 9. Propiedades del factor de crecimiento epidérmico (62).....	51
Figura 10. Mecanismo de acción de los factores de crecimiento	52
Figura 11. Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico	53
Figura 12. Eletroporación	58
Figura 13. Representación esquemática de la teoría de la difusión de la bioadhesión. Capa de polímero azul y capa de moco roja antes del contacto; (b) Al contacto; (c) La interfaz se vuelve difusa después del contacto por un período de tiempo (91).....	69
Figura 14. Extensómetro, vidrios graduados y pesas.	78
Figura 15. Sistema células de Franz	79
Figura 16. Discos de acero para células de Franz	80
Figura 17. Espectrofotómetro utilizado en las medidas de absorbancia de los activos..	80
Figura 18. Estructura de la Carboximetilcelulosa. Imagen modificada de (105).....	91
Figura 19. Líneas celulares a emplear en el estudio de actividad biológica del EGF: fibroblastos de piel (a) y fibroblastos de colon humano CCD-18co.	98
Figura 20. Máquina de electroporación ITD System (Biotronic Advance Develops) .	104
Figura 21. Aplicador especialmente diseñado para la aplicación en encía	104
Figura 22. Aspecto de la emulsión junto con el cabezal aplicador.....	105

Figura 23. Aspecto de las formulaciones	111
Figura 24. Aspecto de la Emulsión liposomada tras centrifugación	112
Figura 25. Valores de pH de la emulsión a diferentes tiempos	117
Figura 26. Valores de viscosidad de la emulsión a diferentes tiempos	117
Figura 27. Valores de pH del hidrogel a diferentes tiempos	119
Figura 28. Valores de viscosidad del hidrogel a diferentes tiempos	119
Figura 29. Espectro de absorción del EGF (10ppm).	123
Figura 30. Espectros de la proteína a distintas concentraciones.....	124
Figura 31. Recta de Calibrado EGF	125
Figura 32. Absorción de alícuotas en tres puntos a 275 nm en el ensayo de cesión. ...	127
Figura 33. Absorción de alícuotas de tres puntos a 275 nm en el ensayo de permeación.	127
Figura 34. Microfotografías del crecimiento celular experimentado con la formulación aplicada (A) blanco; (B) 3 años y (C) recién preparada	130
Figura 35. Inicio y fin análisis microbiológico ensayo aerobios.....	131
Figura 36. Inicio y fin análisis microbiológico Inicio y fin hongos	131
Figura 37: Inicio y fin análisis microbiológico <i>E.Coli</i>	131
Figura 38. Inicio y fin análisis microbiológico <i>Candida Albicans</i>	132
Figura 39: Inicio y fin análisis microbiológico <i>S.Aureus</i> y <i>P. Aeruginosa</i>	132
Figura 40.Box plot Profundidad de sondaje. Figura 41 Box Plot CAL	137
Figura 42. Antes y después de 6 meses de tratamiento (foto de dos pacientes).....	139

ABREVIATURAS:

EGF: Epidermal Growth Factor
HA: Ácido hialurónico
Da: Dalton
CAL: pérdida de inserción clínica
CEJ: unión cemento-esmalte
ACL: Longitud cresta alveolar
PD: profundidad de sondaje
GR: grado de recesión
EDTA: Etileno-diamina-tetra-ácido acético
SRP: Raspado y alisado radicular
GAGs: Glucosamino glicanos
hBD1 y hBD2: β defensinas 1 y 2
PRR: receptores de reconocimiento de patógenos
TLR: Receptores tipo Toll
PAR: receptores activados por proteasas
IL-8: Interleucina 8
C-X-C: quimiocina
CXCL1: ligando de quimiocina 1
CCL2: Ligando de quimiocina 2
CCL5: Ligando de quimiocina 5
CXCL10: quimiocina 10
CMC-Na: Carboximetilcelulosa Sódica
I-3P: tiempo 0 hasta 3 meses
I6P: tiempo 0 y 6 meses tras el tratamiento
I3-6P: entre 3 meses hasta 6 meses
TAMC: Total de Microorganismos Aerobios
TYMC: Total de Hongos y Levaduras

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANATOMÍA DEL PERIODONTO

Periodonto deriva de la palabra peri = alrededor y odonto =diente. Se refiere a todas las estructuras que rodean al diente, incluyendo el cemento, ya que es el medio de sujeción del diente al ligamento periodontal.

1.1.1. Origen del periodonto

El periodonto de protección surge en el momento que se produce como la erupción dental, al romperse el epitelio del surco gingival, el epitelio externo e interno que da origen al diente, y la membrana basal de los ameloblastos se une al esmalte en la región del cuello, formando un bolsa alrededor del mismo en la que alberga el resto de células ameloblásticas las cuales son sustituidas por el epitelio de unión. En el momento de la erupción el tejido epitelial se ulcera dando paso al surgimiento dental quedando libre la corona a la superficie hasta colocarse en posición de oclusión. Durante este proceso el tejido conectivo sufre cambios al incrementar la producción de matriz que le permite elevar la lámina gingival tomando la forma anatómica que le corresponde en las arcadas maxilares. Al finalizar la erupción dental queda una pequeña lengüeta separada del esmalte lo que da origen a la encía libre o marginal y funciona como un sistema de drenaje y limpieza. El periodonto es un sistema de unión protección y fijación del diente, por sus diferentes funciones se divide en dos (1):

1. Periodonto de Protección
2. Periodonto de Inserción

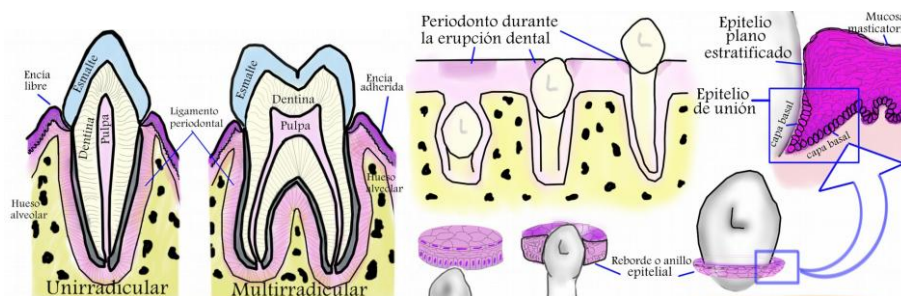


Figura 1. Periodonto durante la erupción dental (1)

1.1.2. Periodonto de protección

El periodonto de protección para su mejor compresión lo dividimos en encía y unión dentogingival. Figura 1. Periodonto durante la erupción dental (1)

a) Encía

La encía es parte de la mucosa de la cavidad bucal, presenta un epitelio plano estratificado, con queratina, sin queratina o paraqueratina.

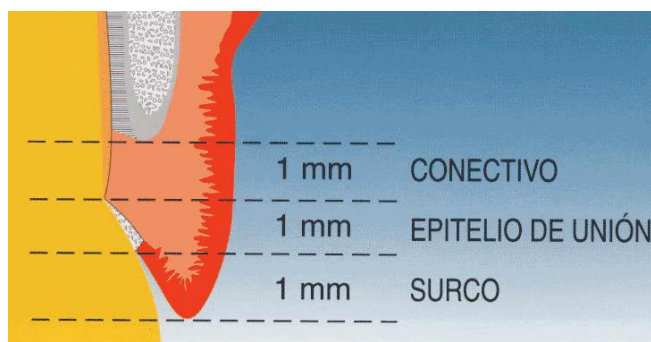


Figura 2. Estructura encía (1)

Presenta una lamina propia de tejido conjuntivo laxo con presencia de muchos vasos sanguíneos y además células propias del tejido que dan origen a la matriz fibrosa y amorfa. Por debajo de la lámina propia presenta tejido conectivo denso o semi-denso según la región. La encía se divide en libre o marginal y fija o adherida.

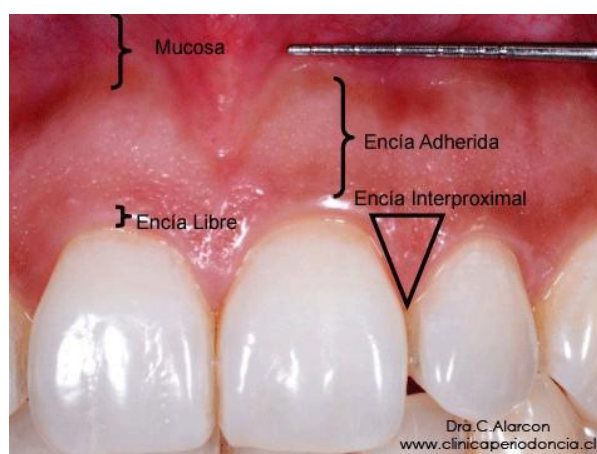


Figura 3. Límites de la encía (www.clinicaperiodoncia.cl)

b) Encía libre o marginal

La podemos identificar como una pequeña lengüeta que se encuentra separada del diente y presenta dos caras, externa e interna, esta última levemente separada del

esmalte del diente, la cual rodea toda la periferia. La cara externa presenta un epitelio plano estratificado queratinizado, con elevación debido a que a este nivel la lamina propia presenta elevaciones formando papilas dérmicas lo que aumenta su vascularidad y sensibilidad, entre diente y diente se observa una lengüeta que forma parte de la misma encía libre llamada interdental.

En la cara interna de la encía libre, la que está directamente adyacente al diente, se conoce como epitelio del surco, que inicia desde el epitelio de unión en la región cervical dental, hasta la región apical del surco gingival, orientado hacia la corona, presenta un epitelio plano estratificado no queratinizado: La profundidad del surco varía entre 0.5 a 1mm, su lamina propia no presenta elevaciones o papilas dérmicas, dando un aspecto liso. La proliferación y descamación del epitelio se produce en un promedio de 7 días, la mitad del tiempo del resto de epitelio de la encía, permitiendo una limpieza constante evitando el crecimiento bacteriano (2).

c) Epitelio de Unión

En la región cervical del epitelio del surco topa directamente con el diente produciendo un sitio de unión epitelial y dental que evita el contacto directo con la región del corión que sostiene al epitelio. Esta región se denomina epitelio de unión o epitelio de fijación. Está compuesto de dos láminas basales, una colindante con el tejido conectivo del corión y otra colindante con el diente en la región cervical. Entre la población celular únicamente se encuentran queratinocitos que no sufren citomorfosis, y se continúan posteriormente con los queratinocitos del epitelio del surco (3).

d) La encía fija o adherida

La encía fija presenta un epitelio plano estratificado queratinizado, ortoqueratinizado y paraqueratinizado. Se inicia donde finaliza la encía libre y termina hasta donde inicia la mucosa alveolar. Conforme el epitelio baja, varia el nivel o grado de queratina hasta desaparecer y quedar como un epitelio de revestimiento. El corión es un tejido conjuntivo denso irregular que le da soporte al epitelio, donde presenta abundantes papilas altas (invaginaciones del tejido conjuntivo laxo dentro del epitelio) lo que le permite una buena vascularización en la zona. Algunas de estas papilas pueden observarse macroscópicamente como arrugas o con la apariencia de piel de naranja. La conexión de la encía libre y adherida se produce por el entrelazamiento de las diferentes

fibras de colágeno formando sitios de anclaje o unión. La encía se une al diente a través de ligamentos de colágeno I que rodean la estructura dentaria de diferentes maneras. De esta forma podemos localizar los siguientes grupos de fibras (4):

1. Gingival o supracrestal: se forma a nivel del cuello como un anillo llamado antiguamente anillo de Kölliker.
2. Gingivo-Dental: son fibras de colágeno nacen en la encía y se insertan en el cemento.
3. Gingivo-alveolar: fibras de colágeno que se extiende desde la encía al periostio del hueso alveolar.
4. Circular: fibras de colágeno en forma circular alrededor del fuelle diente.
5. Periostio dental: fibras de colágeno que nacen en el periostio de la cara externa del hueso alveolar al cemento.
6. Transeptal o dentodental: fibras de tejido conectivo que nacen en la región cervical cemento del diente atravesando todo el tejido hasta la región cervical del cemento del diente adyacente

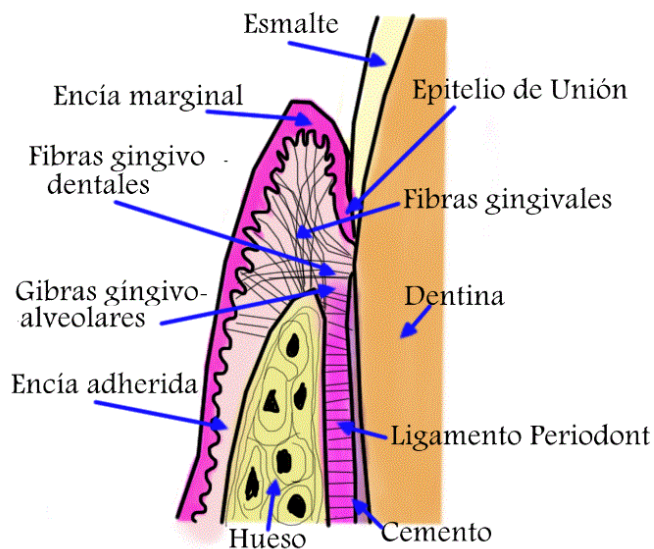


Figura 4. Diferentes tipos de fibras del periodonto de protección (4)

1.1.3. Periodonto de inserción

Está compuesto por tres elementos estructurales formando una unidad funcional:

1. Cemento
2. Ligamento periodontal
3. Hueso Alveolar

Las fibras de colágeno del ligamento periodontal se insertan en el cemento al hueso alveolar, formando una articulación alveolodentaria (gonfosis) lo que le permite tener una fuerza durante la masticación, este tipo de articulación se va modificando conforme avanza la edad debido a los diferentes movimientos que produce la masticación.

1.1.3.1. Cemento

Es un tejido conjuntivo mineralizado de origen ectomesenquima del folículo dentario, el cemento cubre la superficie de la dentina en la porción radicular y la conecta con el ligamento periodontal al hueso alveolar. El cemento tiene mucha similitud con el hueso y crece por aposición, formando láminas concéntricas alrededor de la raíz del diente. La función principal del cemento es proteger la dentina en su porción radicular desde el cuello anatómico hasta el ápice radicular (5).

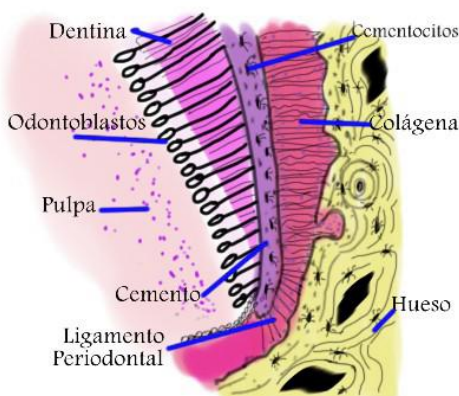


Figura 5. Se observa la relación del cemento, el ligamento periodontal y el hueso alveolar formando la articulación alveolo-dentinal. Imagen modificada de (4)

El cemento no presenta vasos sanguíneos y carece de inserción propia, es más resistente que el hueso pero no es remodelado por lo que soporta más la resorción. El cemento se relaciona con la dentina en su cara interna, con el ligamento periodontal en su cara externa, con el esmalte a nivel de la región cérvico-coronaria y con la pulpa en el extremo apical. El cemento es más delgado en la región del cuello (20 micras) y conforme desciende aumenta su espesor, en medio (50 micras) y al final entre 2 y 4 mm. El cemento presenta un color blanco oscuro y opaco, es levemente permeable semejante al hueso, y es menos radiopaco. El cemento está formado por células y matriz amorfa y fibrosa la cual se encuentra calcificada (6).

1.1.3.2. Ligamento Periodontal

Es una capa de tejido conjuntivo fibroso que une el hueso alveolar con el diente, dándole soporte y resistencia durante la masticación, en el ápice dentario el ligamento se pone en contacto con el tejido pulpar, también se pone en contacto con la encía, formando un conjunto de fibras en diferentes direcciones pero con una misma función de fijar el diente al hueso alveolar, con la edad el ligamento periodontal disminuye, siendo compensado por el cemento. Existe una zona más angosta del ligamento que le permite servir como un eje direccional en relación con las fuerzas masticatorias, es una zona de apoyo o palanca de los movimientos laterales del diente (fulcrum) se localiza en la mitad de la raíz de los dientes uniradicales, en los dientes multiradicales (dos o más raíces) el fulcrum se localiza en el tabique óseo interradicular.

El tejido conjuntivo que forma el ligamento está formado por células de las que podemos mencionar las siguientes

- Fibroblatos, osteoblastos, cementoblastos que son productores de matriz.
- Células Resorptivas como el osteoclasto y el cementoclasto.
- Células de defensa como macrófagos, mastocitos, leucocitos.
- Células madres ectomesenquimas.

El ligamento periodontal está formado por fibras de colágeno tipo I, III, IV, V. Las fibras de colágeno presentan diferentes direcciones, las que se insertan del hueso alveolar al diente son fibras principales, y las que mantienen un orden irregular son secundarias. **Las fibras Primarias** son las que soportan la fuerza de masticación, por su dirección se agrupan en las siguientes.

1. **Grupo de fibras cresta alveolar:** Son fibras oblicuas ascendentes se dirigen de la cresta alveolar hasta por debajo de la unión cemento esmalte. (evitan el movimiento de extrusión).

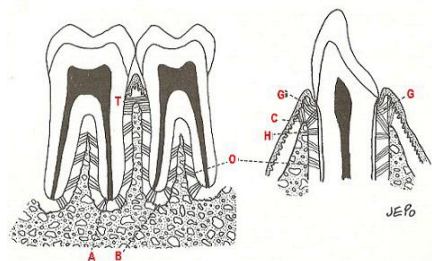


Figura 6. A) Fibras apicales; B) Espacio periapical de Black, C)Fibras de la cresta alveolar; G) Fibras gingivales; T) Fibras transeptales; H) Fibras horizontales, O) Fibras oblicuas Imagen modificada de (6)

2. **Grupo de fibras horizontal o de transición:** Por debajo del grupo anterior en ángulo recto del cemento al hueso, (resiste a la fuerza lateral y horizontal).
3. **Grupo de fibras oblicuas descendentes:** Son las más abundantes, descienden desde el hueso al cemento, son potentes y mantienen al diente dentro del hueso, soportan la fuerza de la masticación (evitan el movimiento de intrusión).
4. **Grupo de fibras apical:** Desde el foramen apical del cemento al fondo del hueso alveolar, evitando los movimientos laterales, extrusión y amortigua los de intrusión.
5. **Grupo de fibras interradicular:** Solo se encuentran en los dientes multirradiculares, las fibras se insertan en la cresta o tabique interradicular hacia el cemento en forma de abanico, evitando movimientos laterales de rotación.
6. Las fibras que están incluidas en el hueso y se insertan al cemento corresponden a las **fibras de Sharpey** y son denominadas perforantes.

Al igual que otros tejidos conjuntivos, el ligamento Periodontal, presenta matriz amorfa rica en proteoglicanos, glucosaminoglicanos (hialurano, condroitín 4, sulfato, condroitín 6 sulfato, dermatán sulfato y heparán sulfato), la matriz amorfa permite una comunicación por difusión de sus elementos, el ligamento periodontal presenta abundantes vasos sanguíneos y linfáticos, también abundan las fibras nerviosas dándole un alto nivel de sensibilidad (4).

1.1.3.3. Hueso alveolar

De los procesos maxilares superiores e inferiores se forma el proceso del hueso alveolar en cual no deja límites de separación formando una unidad. Los procesos alveolares forman cavidades cónicas que alojan la o las raíces de los dientes, las cavidades están revestidas por una capa de periostio que permite la inserción del ligamento periodontal e integrándose con fibras de Sharpey con dirección al cemento. Los procesos alveolares se desarrollan junto con el diente y el ligamento periodontal, el cual finaliza en el momento de la erupción dentaria, adaptándose a los cambios que ocurren con el tiempo por la masticación.

El hueso alveolar forma cavidades cónicas que permitan alojar los dientes, dicha cavidad puede ser simple un conducto, o compleja con dos o tres tabiques internos según el tipo de diente. Las paredes que forman las cavidades presentan dos caras:

- 1) La tabla alveolar libre que puede ser vestibular, palatina o lingual.

2) Los tabiques alveolares son los que separan el alveolo de un diente con otro, llamado también tabique interdentario. El vértice superior del alveolo se llama cresta alveolar, está a nivel del cuello del diente y está revestido por la encía y la unión dentogingival. La tabla vestibular es más delgada en los incisivos y premolares, y más gruesa en los molares. El hueso alveolar es un tejido altamente vascularizado e innervado permitiendo un buen nivel de comunicación con el resto de tejidos que dependen del mismo (1) (7).

1.1.4. Mucosa bucal

La mucosa bucal consta de:

- Epitelio bucal
- Membrana basal, que conecta de epitelio bucal a la lámina propia.
- Lámina-propia, formada por tejido conjuntivo laxo y tejido conjuntivo glandular con la mayor parte de los vasos sanguíneos y los nervios

El epitelio de la mucosa bucal es poliestratificado, similar a los restantes órganos. Está formado por una membrana basal mitóticamente activa, sobre la que se sitúan capas de células progresivamente diferenciadas que se descaman en la zona más superficial. El recambio del epitelio bucal, es decir, la migración de una capa hasta la superficie, dura unos 5-6 días, y éste se puede considerar también como un valor promedio para toda la mucosa bucal. A medida que las células maduran y migran desde la capa basal hasta la superficie, aumentan de tamaño y se hacen progresivamente más aplanadas, al tiempo que incrementan su contenido en filamentos proteicos y pierden orgánulos citoplasmáticos. La composición de esta capa varía de acuerdo con las funciones del tejido; así en el paladar duro y la lengua, que son mucosas masticatorias sujetas a fuerzas de distensión, el epitelio se encuentra queratinizado como la epidermis, mientras que el recubrimiento del interior de las mejillas y de la región sublingual es distensible y no queratinizado. Asimismo, la composición lipídica varía de acuerdo con esta clasificación: en las zonas queratinizadas se presenta una alta proporción de ceramidas y acilceramidas compuestos apolares que se han asociado a la función barrera, y que están en menos concentración en las restantes zonas. El grosor del epitelio también es diferente según su localización. La zona bucal se compone de unas 40 a 50 capas de células. La mucosa oral recibe un importante flujo sanguíneo, a través de la arteria maxilar, (2,4 ml/min./cm²)(8).

En cuanto al moco, es un importante componente que puede afectar a la liberación del fármaco en la mucosa oral. Su espesor varía entre 50 a 400 μm . Su función es fundamentalmente la lubricación y protección de las células epiteliales de agresiones de tipo mecánico o químico. El mucus está formado por mucinas (glicoproteínas de alto peso molecular $2-14 \times 10^6$ Da), capaces de formar un gel viscoelástico. El contenido de agua es del 95% aproximadamente. Además el moco es muy rico en ácido siálico y residuos de sulfato, por lo que a pH fisiológico se encuentra cargado negativamente, jugando un papel clave en la mucoadhesión (9).

1.2. INTRODUCCIÓN A LAS ENFERMEDADES PERIODONTALES

“La salud es un estado de completo bienestar físico, mental y social. y no solo la ausencia de enfermedad o dolencia”(10).

En base a esta definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se deduce que la salud periodontal debe definirse como un estado libre de enfermedad periodontal inflamatoria que permite a un individuo funcionar normalmente y evitar consecuencias (mentales o físicas), debido a la enfermedad. Sobre la base de este marco general de salud, la salud periodontal debe basarse en la ausencia de enfermedad, asociada con gingivitis, periodontitis u otras afecciones periodontales, y puede incluir pacientes con antecedentes de gingivitis o periodontitis tratadas con éxito u otras afecciones periodontales, que han sido y son capaces de mantener su dentición sin signos de inflamación gingival clínica. Además, la salud periodontal clínica abarca el control y el análisis de los procesos inmunológicos que involucran niveles de marcadores biológicos e inflamatorios compatibles con la homeostasis (11) (12).

La definición de enfermedad es la alteración de una situación biológica, principalmente, en la cavidad oral, se deben establecer las condiciones de enfermedad para determinar la salud oral, estado caracterizado por la ausencia de dolor orofacial crónico, cáncer bucal o de garganta, úlceras bucales, defectos congénitos, enfermedades periodontales, caries dental y pérdida dental, así como otras enfermedades y trastornos que afectan a la cavidad bucal. Por lo tanto, toda condición favorable a estas situaciones se considera patológico (13).

La periodontitis es una enfermedad infecciosa microbiana localizada en el periodonto. Se caracteriza por inflamación, pérdida de soporte del tejido periodontal, presencia de bolsas periodontales y sangrado gingival (14).

Esto se detecta como pérdida de inserción clínica (CAL) por evaluación circunferencial de la dentición erupcionada con una sonda periodontal estandarizada con referencia a la unión cemento-esmalte (CEJ) (15).

La periodontitis se define como una enfermedad inflamatoria crónica que actualmente puede ser controlada con éxito, y los dientes se pueden mantener sanos y llegar a controlar la posible caída. La periodontitis puede permanecer estable (en remisión) o

entrar en períodos de exacerbación. Por lo tanto, la medicina dental de precisión requiere una evaluación de riesgos individuales y continua como parte del manejo óptimo del paciente. Una definición de salud y bienestar periodontal es fundamental para establecer puntos finales terapéuticos ideales y aceptables para las terapias, para evaluar sistemáticamente la carga biológica de la inflamación, para categorizar la prevalencia de la enfermedad gingival y periodontal en poblaciones y para evaluar el riesgo individualizado para el desarrollo futuro de la enfermedad.

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria que causa alteraciones patológicas en los tejidos dentales, que pueden conducir a la pérdida de los dientes si no se tratan. Las encuestas nacionales han demostrado que la mayoría de los adultos padecen periodontitis moderada, y hasta el 15% de la población está afectada por periodontitis generalizada grave en algún momento de sus vidas (16) (17).

La importante carga de la enfermedad periodontal y su impacto en la salud general y la calidad de vida del paciente sugieren una necesidad clínica para el manejo efectivo de esta condición (18) (19) (20).

Las enfermedades periodontales ya no pueden considerarse infecciones bacterianas simples. Más bien, son enfermedades complejas de naturaleza multifactorial que involucran una interacción compleja entre la microbiota subgingival, las respuestas inmunes e inflamatorias del huésped y los factores de modificación ambiental (21) (22). Por lo tanto, la salud periodontal no debe considerarse únicamente en el contexto de los niveles de placa/bacterias y el control, sino que debe abarcar una consideración y evaluación holística de todos los factores responsables de la aparición de la enfermedad, así como la restauración y el mantenimiento de la salud. Los determinantes de la salud periodontal se clasifican en 3 categorías principales; microbiológico, huésped y ambiente.

Microbiological Determinants of Clinical Periodontal Health

Supragingival plaque composition
Subgingival biofilm composition

Host Determinants of Clinical Periodontal Health

1. Local predisposing factors
 - 1.1 Periodontal pockets
 - 1.2 Dental restorations
 - 1.3 Root anatomy
 - 1.4 Tooth position and crowding
2. Systemic modifying factors
 - 2.1 Host immune function
 - 2.2 Systemic health
 - 2.3 Genetics

Environmental Determinants of Clinical Periodontal Health

Smoking
Medications
Stress
Nutrition

Tabla 1. Determinantes de la salud periodontal clínica

1.2.1. Clasificación de la periodontitis

El workshop de 1989 reconoció que la periodontitis tenía varias presentaciones clínicas distintas, diferentes edades de inicio y fases de progresión (11).

Basándose en estas variables, el taller clasificó la periodontitis como prepúber, juvenil (localizada y generalizada), adulta y rápidamente progresiva. El Taller Europeo de 1993 determinó que la clasificación debería simplificarse y propuso agrupar la periodontitis en dos encabezados principales: periodontitis de adultos y de inicio temprano.

En 1996 se determinó que no había pruebas nuevas suficientes para cambiar la clasificación (23).

Posteriormente se hicieron cambios importantes en la clasificación de la periodontitis de 1999(24)(25)(26). La periodontitis se reclasificó como crónica, agresiva (localizada y generalizada), necrotizante y como manifestación de enfermedad sistémica. Desde el workshop de 1999, ha surgido nueva información sustancial gracias a estudios de población, investigaciones de ciencias básicas y la evidencia de estudios prospectivos que evalúan factores de riesgo ambientales y sistémicos. El análisis de esta evidencia ha llevado al workshop de 2017 a desarrollar un nuevo marco de clasificación para la periodontitis (11).

CLASSIFICATION OF PERIODONTAL AND PERI-IMPLANT DISEASES AND CONDITIONS 2017

Periodontal Diseases and Conditions										
Periodontal Health, Gingival Diseases and Conditions Chapple, Mealey, et al. 2018 Consensus Rept link Trombelli et al. 2018 Case Definitions link			Periodontitis Papapanou, Sanz et al. 2018 Consensus Rept link Jepsen, Caton et al. 2018 Consensus Rept link Tonetti, Greenwell, Kornman. 2018 Case Definitions link			Other Conditions Affecting the Periodontium Jepsen, Caton et al. 2018 Consensus Rept link Papapanou, Sanz et al. 2018 Consensus Rept link				
Periodontal Health and Gingival Health	Gingivitis: Dental Biofilm-Induced	Gingival Diseases: Non-Dental Biofilm-Induced	Necrotizing Periodontal Diseases	Periodontitis	Periodontitis as a Manifestation of Systemic Disease	Systemic diseases or conditions affecting the periodontal supporting tissues	Periodontal Abscesses and Endodontic-Periodontal Lesions	Mucogingival Deformities and Conditions	Traumatic Occlusal Forces	Tooth and Prosthesis Related Factors
Peri-Implant Diseases and Conditions										
Berglundh, Armitage et al. 2018 Consensus Rept link										
Peri-Implant Health	Peri-Implant Mucositis			Peri-Implantitis			Peri-Implant Soft and Hard Tissue Deficiencies			

Tabla 2. Clasificación de la periodontitis 2017 Imagen modificada de (11)

En los últimos 30 años, la clasificación de la periodontitis se ha modificado repetidamente en un intento por alinearla con la evidencia científica emergente. El grupo de trabajo acordó que, de acuerdo con los conocimientos actuales sobre fisiopatología, se pueden identificar tres formas de periodontitis: periodontitis necrotizante, (27) periodontitis como una manifestación de enfermedad sistémica (28) y las formas de la enfermedad previamente reconocidas como "crónicas" o "agresivas", ahora agrupados en una sola categoría, "periodontitis" (29)(30) (31).

Al revisar la clasificación, los autores acordaron un marco de clasificación para la periodontitis caracterizado por un sistema de clasificación multidimensional que podría adaptarse con el tiempo a medida que surgen nuevas pruebas (32).

La nueva clasificación de enfermedades y condiciones periodontales también incluye enfermedades sistémicas y afecciones que afectan a los tejidos de soporte periodontal. Se reconoce que existen raros trastornos sistémicos, como el síndrome de Papillon Lefèvre, que generalmente resultan en la presentación precoz de la periodontitis severa. Otras afecciones sistémicas, como las enfermedades neoplásicas, pueden afectar al tejido periodontal independiente de la biopelícula de la placa dental inducida por periodontitis, y tales hallazgos clínicos también deben ser clasificados basados en la enfermedad sistémica primaria y ser agrupados como "Enfermedades sistémicas o afecciones que afectan los tejidos periodontales de soporte" (33).

Sin embargo, existen enfermedades sistémicas comunes, como la descontrolada diabetes mellitus, con efectos variables que modifican el curso de periodontitis. Estos parecen ser parte de la naturaleza multifactorial de las enfermedades complejas como la periodontitis y se incluyen en la nueva clasificación clínica de la periodontitis como descriptor en las fases y en el grado de clasificación. Aunque las variables comunes de la periodontitis pueden alterar sustancialmente la aparición de la enfermedad, la gravedad y la respuesta al tratamiento, la evidencia actual no apoya una fisiopatología única en pacientes con diabetes y periodontitis (Tabla 3).

Periodontal Manifestations of Systemic Diseases and Developmental and Acquired Conditions: Consensus Report
 Jepsen, Caton et al. 2018
Active link to consensus report

PERIODONTAL MANIFESTATIONS OF SYSTEMIC DISEASES AND DEVELOPMENTAL AND ACQUIRED CONDITIONS

1. Systemic diseases or conditions affecting the periodontal supporting tissues

Albandar et al. 2018 [link](#)

2. Other Periodontal Conditions

Papapanou, Sanz et al. 2018 [link](#)

Herrera et al. 2018 [link](#)

- a. Periodontal Abscesses
- b. Endodontic-Periodontal Lesions

3. Mucogingival deformities and conditions around teeth

Cortellini & Bissada 2018 [link](#)

- a. Gingival phenotype
- b. Gingival/soft tissue recession
- c. Lack of gingiva
- d. Decreased vestibular depth
- e. Aberrant frenum/muscle position
- f. Gingival excess
- g. Abnormal color
- h. Condition of the exposed root surface

4. Traumatic occlusal forces

Fan & Caton 2018 [link](#)

- a. Primary occlusal trauma
- b. Secondary occlusal trauma
- c. Orthodontic forces

5. Prostheses and tooth-related factors that modify or predispose to plaque-induced gingival diseases/periodontitis

Ercoli & Caton 2018 [link](#)

- a. Localized tooth-related factors
- b. Localized dental prostheses-related factors

Tabla 3. Enfermedades sistémicas y periodontitis Imagen modificada de (11)

1.2.1.1. Condiciones mucogingivales

Las nuevas definiciones de casos relacionadas con el tratamiento de la recesión gingival se basan en la pérdida interproximal del vínculo clínico y también incorporan la evaluación de la raíz expuesta y la unión del esmalte de cemento. El informe de consenso presenta una nueva clasificación de recesión gingival que combina parámetros clínicos que incluyen fenotipo gingival, así como características de la superficie radicular expuesta. En el informe de consenso, el término biotipo periodontal se reemplazó por fenotipo periodontal (Tabla 4) (33).

1.2.1.2. Traumatismo oclusal y fuerzas oclusales traumáticas

El trauma oclusal es un elemento crucial en el diagnóstico y tratamiento clínico de la periodontitis. El trabajo de posicionamiento aportado había ofrecido un resumen general de este asunto complejo en la práctica clínica. Tras un debate considerable, las fuerzas oclusales excesivas fueron rebautizadas como fuerza oclusal traumática, recalcando su efecto negativo sobre los tejidos de sostén periodontal y los dientes. Existe una preocupación creciente sobre la influencia potencial de las fuerzas ortodóncicas sobre los tejidos periodontales (por ejemplo, recesión gingival y pérdida ósea) y los dientes (por ejemplo, reabsorción radicular y estado pulpar), especialmente en tratamientos ortodóncicos coadyuvantes en pacientes con periodontitis sin un control previo efectivo del biofilm oral y la inflamación periodontal. Por ello, se añadieron las fuerzas ortodóncicas como elemento a la clasificación previa de trauma oclusal, compuesta por trauma oclusal primario y trauma oclusal secundario. Las fuerzas oclusales traumáticas pueden dar como resultado un traumatismo oclusal (la lesión) y un desgaste excesivo o fractura de los dientes. No hay evidencia de estudios humanos que impliquen un traumatismo oclusal en la progresión de la pérdida de inserción en la periodontitis (Tabla 3. Enfermedades sistémicas y periodontitis Imagen modificada de (11) (34).

1.2.1.3. Factores relacionados con prótesis dentales y dientes

La sección sobre factores relacionados con prótesis se amplió en la nueva clasificación. Se ha documentado que el estado periodontal puede ser afectado de forma significativa por múltiples factores relacionados con los dientes y las prótesis. Los efectos reales sobre el inicio/progresión de las enfermedades periodontales varían entre personas con diferentes grados de susceptibilidad, niveles de control de placa y acceso al tratamiento

oral/periodontal. En la clasificación de 1999, estos factores de riesgo habían sido enumerados como factores localizados relacionados con los dientes que modifican o predisponen a las enfermedades gingivales/periodontitis inducidas por placa. El grupo de trabajo evaluó de forma cuidadosa las cuestiones y variables asociadas y propuso los cambios necesarios en los términos y la clasificación de estos factores locales. Merece la pena observar que el término de uso habitual anchura biológica fue sustituido por inserción de tejido supracrestal para reflejar su naturaleza histológica para un tratamiento oral/periodontal efectivo. La clasificación anterior fue modificada enumerando estos factores localizados relacionados con los dientes y los factores localizados relacionados con las prótesis dentales, respectivamente (Tabla 3. Enfermedades sistémicas y periodontitis Imagen modificada de (11).

Por ello, la nueva clasificación identificó tres formas diferentes de periodontitis, basándose en su fisiopatología:

- Periodontitis necrosante, explicada conjuntamente con las EPN.
- Periodontitis como manifestación directa de enfermedades sistémicas, explicada en otra sección.
- Periodontitis, que debe ser caracterizada adicionalmente aplicando un abordaje de clasificación mediante estadios y grados

El estadio describe la gravedad de la enfermedad en su presentación inicial y la complejidad prevista del manejo de la enfermedad; adicionalmente, también se registran la extensión y distribución de la enfermedad en la boca. El grado describe la velocidad y el riesgo de progresión, las probabilidades de obtener un mal resultado tras el tratamiento y su impacto sobre la salud general. La definición de la periodontitis también fue debatida. Se aceptó que la periodontitis se define, como característica principal, por una pérdida de soporte de los tejidos periodontales debida a inflamación: habitualmente se utiliza como umbral una pérdida de inserción clínica interproximal de ≥ 2 mm o ≥ 3 mm en dos o más dientes no adyacentes. Para la nueva definición, se ha propuesto que en el contexto de tratamiento clínico, un “caso de periodontitis” debería presentar: • Pérdida de inserción clínica (CAL) interdentaria en dos o más dientes no adyacentes, o bien • CAL vestibular ≥ 3 mm con bolsas de > 3 mm en dos o más dientes. Se enumeraron una serie de excepciones, para evitar situaciones en las que la pérdida de inserción no estaba asociada a periodontitis, entre las que se incluyen: recesión gingival por razones traumáticas, caries en la región cervical, CAL en la cara

distal de un segundo molar (posiblemente asociada a una mal posición o extracción del tercer molar), lesión endodóntica o fractura radicular vertical (35).

Periodontitis Consensus Report
Papapanou, Sanz et al. 2018
Active link to consensus report

Staging and Grading of Periodontitis:
Framework and Proposal of a New
Classification and Case Definition
Tonetti, Greenwell, Kornman 2018
Active link to case definitions

FORMS OF PERIODONTITIS

1. Necrotizing Periodontal Diseases

Herrera et al. 2018 [link](#)

- a. Necrotizing Gingivitis
- b. Necrotizing Periodontitis
- c. Necrotizing Stomatitis

2. Periodontitis as Manifestation of Systemic Diseases

Jepsen, Caton et al. 2018 Consensus Rept [link](#) Albandar et al. 2018 [link](#)

Classification of these conditions should be based on the primary systemic disease according to the International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD) codes

3. Periodontitis

Fine et al. 2018 [link](#)

Needleman et al. 2018 [link](#)

Billings et al. 2018 [link](#)

- a. **Stages:** Based on Severity¹ and Complexity of Management²
 - Stage I: Initial Periodontitis
 - Stage II: Moderate Periodontitis
 - Stage III: Severe Periodontitis with potential for additional tooth loss
 - Stage IV: Severe Periodontitis with potential for loss of the dentition
- b. **Extent and distribution**³: localized; generalized; molar-incisor distribution
- c. **Grades:** Evidence or risk of rapid progression⁴, anticipated treatment response⁵
 - i. Grade A: Slow rate of progression
 - ii. Grade B: Moderate rate of progression
 - iii. Grade C: Rapid rate of progression

¹ Severity: Interdental clinical attachment level (CAL) at site with greatest loss; Radiographic bone loss & tooth loss

² Complexity of management: Probing depths, pattern of bone loss, furcation lesions, number of remaining teeth, tooth mobility, ridge defects masticatory dysfunction

³ Add to Stage as descriptor: localized <30% teeth, generalized ≥ 30% teeth

⁴ Risk of progression: direct evidence by PA radiographs or CAL loss, or indirect (bone loss/age ratio)

⁵ Anticipated treatment response: case phenotype, smoking, hyperglycemia

Tabla 4. Clasificación de periodontitis según workshop 2018 (11)

1.2.1.4. Periimplantitis

La periimplantitis se definió como una afección patológica asociada a la placa que se presenta en el tejido que rodea los implantes dentales, caracterizada por una inflamación en la mucosa periimplantaria y la subsiguiente pérdida progresiva de hueso de soporte. Se supone que la mucositis periimplantaria precede a la periimplantitis. La periimplantitis se asocia con un mal control de la placa y con pacientes con antecedentes de periodontitis severa. La aparición de la periimplantitis puede producirse de forma temprana durante la fase de seguimiento, según los datos radiográficos. La

periimplantitis, en ausencia de tratamiento, parece progresar en un patrón no lineal y acelerado.

1.2.1.5. Diagnósis

El diagnóstico es la pérdida de inserción clínica (CAL) y la pérdida ósea alveolar evaluada radiológicamente (ACL). Las principales características que identifican la periodontitis son la pérdida de soporte del tejido periodontal debido a la inflamación es la característica principal de la periodontitis. Se usa comúnmente un umbral de CAL de ≥ 2 mm o ≥ 3 mm a ≥ 2 dientes no adyacentes. Se confirma la presencia de pérdida de tejido interproximal a través de evaluaciones radiográficas de la pérdida ósea. Las descripciones clínicamente significativas de periodontitis deben incluir la proporción de sitios que sangran al sondear, y el número y la proporción de dientes con profundidad de sondaje sobre ciertos umbrales (comúnmente ≥ 4 mm y ≥ 6 mm) y de dientes con CAL de ≥ 3 mm y ≥ 5 mm (14).



Figura 7. Encía sana y enferma Imagen tomada de (36)

¿Cómo definimos a un paciente como un caso de periodontitis? En el contexto de la atención clínica, un paciente es un "caso de periodontitis" si: 1. La CAL interdental se puede detectar en ≥ 2 dientes no adyacentes, o 2. La CAL bucal u oral de ≥ 3 mm con bolsas ≥ 3 mm se puede detectar en ≥ 2 dientes, pero la CAL observada no puede atribuirse a causas no relacionadas con periodontitis, tales como: 1) recesión gingival de origen traumático; 2) caries dental que se extiende en el área cervical del diente; 3) la presencia de CAL en la cara distal de un segundo molar y asociada con una mala posición o extracción de un tercer molar, 4) una lesión endodóntica que drena a través del periodonto marginal; y 5) la ocurrencia de una fractura de raíz vertical. Es importante tener en cuenta: Algunas afecciones clínicas distintas de la periodontitis se presentan con pérdida de inserción clínica. Las definiciones de periodontitis basadas en

la pérdida ósea radiográfica marginal sufren graves limitaciones, ya que no son lo suficientemente específicas y no detectan la periodontitis leve a moderada (27).

Las enfermedades gingivales y periodontales están catalogadas entre las afecciones más comunes del género humano, la gingivitis afecta aproximadamente el 80% de la población y más del 70% de la población adulta ha padecido de gingivitis, periodontitis o ambas. En torno al 90% de la población española mayor de 35 años presenta enfermedad periodontal en algún grado. El termino enfermedades periodontales engloba a los procesos patológicos que afectan a los tejidos de soporte de los dientes, desde la inflamación de la encía (gingivitis) hasta su extensión hacia el ligamento periodontal y el hueso adyacente, dando lugar a la aparición de bolsas periodontales y provocando una pérdida ósea y de inserción progresiva (periodontitis). La periodontitis es un proceso inflamatorio de los tejidos de soporte del diente en el cual se produce una migración hacia la región apical de los tejidos de inserción de los dientes y una pérdida del hueso y del ligamento periodontales interrumpiéndose su unión al cemento.

A medida que la enfermedad avanza, la retracción de las encías produce que los dientes se vuelvan móviles o "suelos" pudiendo requerir que sean extraídos (37).

Se trata de desordenes multifactoriales, congénitos o adquiridos de los tejidos de soporte del diente (38) pueden tener un origen inflamatorio, traumático, neoplásico, genético o metabólico. Sin embargo y generalmente, el término enfermedad periodontal recoge inflamaciones (gingivitis y periodontitis) debidas a infecciones producidas por varios microorganismos. La gingivitis y la periodontitis son enfermedades infecciosas que afectan con frecuencia a la población y la enfermedad periodontal es una de las principales causas de pérdida dentaria. En la periodontitis, no sólo hay inflamación, sino que se produce también una destrucción de los tejidos conectivos de soporte del diente o periodonto. La periodontitis se diferencia de la gingivitis porque la inflamación de los tejidos de soporte del diente produce cambios destructivos progresivos que suelen conducir a la pérdida del hueso y del ligamento periodontal. Esto último ocurre por una extensión del proceso inmuno-inflamatorio desde la encía al hueso adyacente y al ligamento (39) (40).

La enfermedad puede ser cíclica si no se trata con eficacia y en tiempo. El seguir teniendo una mala higiene bucal después del tratamiento puede producir con el tiempo la degeneración completa del tejido conectivo y la pérdida de dientes (41). Existen muchos síntomas de la presencia de una enfermedad periodontal:

- Sangrado de las encías al cepillarse los dientes.
- Encías rojas, inflamadas y dolorosas
- Encías separadas del hueso.
- Halitosis persistente.
- Pus entre los dientes y en las encías.
- Dientes sueltos o que se estén separando.
- Cambios en la mordida.
- Cambios en la adaptación de las dentaduras parciales.
- Aparición de oquedades (“agujeros negros” o *Black holes*).

A pesar de estos síntomas la mayoría de la gente puede tener una enfermedad periodontal sin notar ninguno de ellos y por eso frecuentemente puede pasar inadvertida.

La retracción gingival puede deberse a causas naturales como por ejemplo un exceso de cepillado, presencia de placa bacteriana, uso de prótesis, bruxismo, envejecimiento, etc. Aunque la placa es la causa principal de la enfermedad periodontal, existen otros factores que pueden afectar la salud de las encías. El estilo de vida, la dieta y hábitos como fumar, definitivamente afectan la salud bucal. Una dieta de bajo contenido nutritivo o el estrés disminuyen las defensas normales del cuerpo para combatir cualquier infección. Las personas que fuman o mascan tabaco con regularidad presentan más irritación de encías que los no fumadores.

La retracción puede producirse por causas exógenas como es el caso de la toxicidad celular que se deriva del tratamiento intensivo del cáncer, las etapas más avanzadas de enfermedades que afectan el sistema inmunológico tales como leucemia y SIDA, las diabetes no controladas en las cuales el organismo tiene mayor predisposición a infecciones y a cicatrizar peor o también puede ser debida a los cambios hormonales durante el embarazo.

Se ha demostrado que la gingivitis no progresa necesariamente a periodontitis como se pensaba anteriormente, pero la periodontitis puede frecuentemente producirse sin ningún signo clínico de la gingivitis (es decir, enrojecimiento, inflamación y sangrado de las encías)

La demanda de los pacientes para la obtención de resultados estéticamente agradables después de una retracción gingival presenta importantes desafíos para los dentistas.

Cuando hablamos de estética aplicada a las encías, los aspectos a cumplir han sido definidos por figuras clave de la odontología siguiendo los siguientes criterios:

- De color rosa pálido
- Ligeramente punteado
- Arcada dental simétrica
- Primera y tercera arcadas misma altura
- Segunda arcada más pequeñas
- Aumento a medida que avanza hacia atrás / arriba

La presencia de oquedades en el triángulo interdental, también conocido como "*blackholes*" (agujeros negros), tiene un significativo efecto negativo en la estética de las encías y es uno de los aspectos primordiales a la hora de tratar el retraimiento de las encías.

1.3. TRATAMIENTO HASTA LA ACTUALIDAD

A pesar de que estas enfermedades bucodentales van disminuyendo muy lentamente con respecto a décadas anteriores, es posible reducir simultáneamente la carga de enfermedades bucodentales y la de otras enfermedades crónicas si se abordan los factores de riesgo comunes, como el consumo de tabaco y una dieta desequilibrada. La reducción de la ingesta de azúcares simples y una alimentación adecuadamente balanceada previenen la caries dental y la pérdida prematura de los dientes. Una vez instaurada la enfermedad periodontal, el objetivo principal es controlar el dolor y la inflamación con los analgésicos y antiinflamatorios, combinándolos con antisépticos, si ello no fuera suficiente se recurre al tratamiento antibacteriano sistémico, aunque siempre manteniendo el desbridamiento mecánico o la desestructuración del biofilm por medios físicos.

1.3.1. Antisépticos

Los antisépticos y desinfectantes son agentes que inhiben el desarrollo o destruyen microorganismos por contacto. Un buen antiséptico o un buen desinfectante debe ser químicamente estable, económico, no teñir, tener color y olor agradables, ser microbicida y no solo inhibitorio, destruir las esporas, ser activo contra todos los patógenos, requerir un tiempo de exposición breve, no ser irritante para los tejidos y debe ser fácilmente eliminado. Se emplean para el tratamiento de conductos, prevención y tratamiento de la placa dental y la enfermedad periodontal, tratamiento de gingivitis, aftas y otras afecciones bucales infecciosas, preparación preoperatoria de la mucosa bucal por reducción de la concentración bacteriana y disminución de la infección local y a distancia y como componentes de ciertos dentífricos.

1.3.2. Antibacterianos

Los antibióticos son eficaces pero no se deben usar como medida preventiva, ya que incrementan los niveles de resistencia y deben emplearse con indicaciones muy precisas. El uso de antimicrobianos sistémicos puede mejorar los resultados clínicos y microbiológicos tras el tratamiento mecánico periodontal. Los betalactámicos son, ~~son~~ con diferencia, los antibióticos más utilizados en odontología. Están indicados en el tratamiento de las infecciones bacterianas orales, particularmente las de origen odontogénico. El fármaco más usado es la Amoxicilina. Entre las cefalosporinas se

encuentran la cefalexina, cefadroxilo, cefazolina, cefuroxima. Por su parte los macrólidos que se utilizan habitualmente en odontología son eritromicina, espiramicina, azitromicina, claritromicina (42).

1.3.3. Analgésicos y antiinflamatorios

Los fármacos con efecto sobre el dolor y la inflamación son de uso común en odontología. El paracetamol es un analgésico sin efecto antiinflamatorio ni actividad antiagregante plaquetaria, lo que le convierte en el analgésico de uso preferente y muy común en odontología, ya que los AINE convencionales tienden a incrementar el riesgo de prolongación del sangrado en las intervenciones odontológicas. En cuadros de dolor intenso se puede recurrir a analgésicos opioides de actividad intermedia., como codeína, tramadol o a AINE, cuando no existen condiciones hemorrágicas. Los corticosteroides son ampliamente empleados como inmunosupresores o como antiinflamatorios (36).

1.3.4. Terapia periodontal regenerativa

Comprende técnicas especialmente diseñadas para restaurar aquellas partes de las estructuras de soporte de los dientes que se han perdido debido a periodontitis o trauma gingival. La denudación de una superficie radicular con una sensibilidad radicular resultante representa una indicación adicional para aplicar la terapia periodontal regenerativa y lograr tanto la reducción de la sensibilidad radicular como la mejora de la estética. La terapia y el mantenimiento periodontales profesionales, combinados con el control de los factores de riesgo, muestran una reducción efectiva de la progresión de la enfermedad periodontal. Sin embargo, a diferencia de los enfoques convencionales de la terapia periodontal antiinflamatoria, los procedimientos regenerativos dirigidos a reparar los tejidos periodontales perdidos, incluidos el hueso alveolar, el ligamento periodontal y el cemento radicular, siguen siendo más difíciles (43) (33).

En general, sin embargo, se muestra que el resultado clínico de las técnicas de regeneración periodontal depende de 1) factores asociados con el paciente como el control de la placa, los hábitos de fumar, la infección periodontal residual o la exposición a la membrana en los procedimientos de regeneración tisular guiada, 2) los efectos de las fuerzas oclusales que ejercen cargas intermitentes en dimensiones axiales

y transversales, así como 3) factores asociados con las habilidades clínicas del operador, como la falta de cierre primario de la herida quirúrgica (44).

1.3.5. Bio-modificación de la superficie de la raíz del diente

En los últimos años, se ha introducido la bio-modificación de la superficie de la raíz con proteínas de la matriz del esmalte durante la cirugía periodontal y después de la desmineralización con etileno-diamina-tetra-ácido acético (EDTA) para promover la regeneración periodontal. Hasta ahora, los derivados de la matriz de esmalte solos o en combinación con injertos han demostrado su potencial para tratar eficazmente los defectos intraóseos y los resultados clínicos parecen ser estables a largo plazo (45).

1.4. ÁCIDO HIALURÓNICO

El tejido conectivo periodontal contiene estructuras fibrilares como el colágeno, fibras elásticas y reticulares en una matriz amorfa de glucosaminoglicanos.

El ácido hialurónico (HA) es un glicosaminoglicano con una estructura que varía entre 2-10000 disacáridos y un peso molecular inferior o igual a 10⁶ Da (46). El HA es un componente del tejido conectivo y se detectó por primera vez su presencia en las encías en 1981 (47) (48). Ha sido estudiado como un marcador de la inflamación en el fluido crevicular de las encías (49) y como un factor significativo en el crecimiento desarrollo y reparación de tejidos.

Es el más abundante glucosaminoglicano de alto peso molecular de la matriz extracelular del tejido blando periodontal.

Es un componente esencial del ligamento periodontal y juega un papel importante en la adhesión, migración y diferenciación celular. Además su gran tamaño y su carga negativa permite la absorción de grandes cantidades de agua confiriendo hidratación a los tejidos esta función ejerce la amortiguación de la fuerza de mordida en el ligamento periodontal. También tiene efecto bacteriostático y antiinflamatorio. Juega un papel importante en las heridas crónicas durante las etapas asociadas al proceso de cicatrización de la herida en los tejidos periodontales tanto mineralizados como no mineralizados. Estas propiedades hacen que se utilice el HA tanto en medicina como en odontología, para regenerar articulaciones y tejidos dañados, así como estimular el proceso antiinflamatorio de diferentes tipos de lesiones. Por otra parte la destrucción causada por las enfermedades o la desinflamación de las encías debida al tratamiento de éstas, o los implantes dentales crean los triángulos negros los cuales son unos espacios entre los dientes que aparecen como consecuencia de la pérdida parcial o total de encía. Normalmente estos espacios están rellenos por la papila interdental y son un elemento muy importante de una sonrisa agradable y natural. La aparición de estos triángulos negros puede afectar la estética, el habla y crear sensibilidad dental.

Hay estudios (50) que demuestran los efectos beneficiosos de la aplicación tópica del HA en el tratamiento de la gingivitis, reduciendo el índice de sangrado. Pocos estudios se han realizado valorando el efecto de la aplicación de HA después del raspado y alisado radicular (SRP) en el tratamiento no quirúrgico de la periodontitis. Algunos autores (51) demuestran mejorías en el índice de sangrado, pero no en las variables periodontales de enfermedad. Sin embargo (52) confirman la mejoría en la profundidad

de sondaje de las bolsas periodontales tratadas. Por lo tanto sería un producto muy específico como coadyuvante en el tratamiento no quirúrgico (SRP) de la periodontitis, mejorando los resultados en cuanto a inflamación y cicatrización de los tejidos periodontales (53).

Durante los últimos años se ha notado un interés creciente en el ámbito mundial, sobre las investigaciones en el campo de las sustancias poliméricas a partir de fuentes naturales. En la industria médico-farmacéutica y cosmética, muchos de estos compuestos tienen numerosas aplicaciones tanto como sustancias auxiliares en la elaboración de diferentes medicamentos, así como también desde el punto de vista terapéutico. Entre estos materiales poliméricos se encuentra el ácido hialurónico (HA) y otros polisacáridos que conforman una gran familia de biomateriales conocidos como glucosaminoglicanos (GAGs). El HA es por su naturaleza un carbohidrato no reductor y forma parte de la matriz extracelular del tejido conectivo. Es un heteropolisacárido de elevada masa molar (M) formado por unidades de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina, constituido por una unidad repetitiva [-4)- β -D-glucuronopiranosil- β (1-3)-2-acetamido-2-dexosi-Dglucopiranosido.

Su unidad estructural fue definida por Weissman y Meyer (1954) y está constituida por el ácido D-glucurónico y la N-acetilglucosamina unidas en una estructura dimérica formada por enlaces β -(1-3) y β -(1-4)

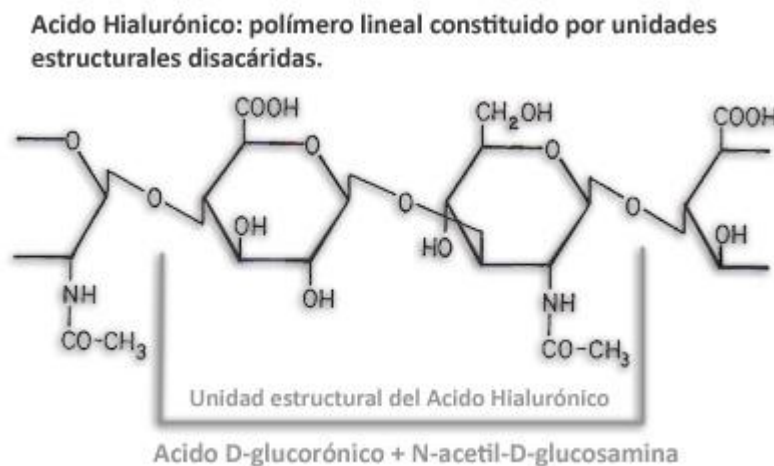


Figura 8. Estructura general de la unidad dimérica del ácido hialurónico en la que se observa al ácido glucurónico enlazado a la N-acetilglucosamina mediante enlace β -(1-3) y esta unidad dimérica no reductora a la otra unidad mediante enlace β -(1-4) (54)

Su masa molar puede llegar a valores en el orden de 1×10^7 g. mol⁻¹ aunque se han encontrado fracciones de 3×10^4 hasta 5×10^4 g. mol⁻¹ de interés terapéutico. La masa molar sin embargo, puede variar según el procedimiento de aislamiento y purificación. En años recientes se presenta un método de obtención de fracciones hasta 5×10^3 g.mol⁻¹ con un bajo índice de polidispersión, basado en el tratamiento combinado del HA de elevada masa molar con ultrasonido y con el empleo de hipoclorito de sodio o el uso de impelentes con esfuerzo cortante, que mediante degradación mecánica puede reducirlo hasta 5×10^3 g.mol⁻¹.

1.4.1. Síntesis del ácido hialurónico

El ácido hialurónico es un polímero sintetizado biológicamente por células en el cuerpo mediante procesos enzimáticos, continuos y altamente controlados. El ácido hialurónico es producido y secretado por los fibroblastos (células del tejido conectivo), los queratinocitos (células predominantes de la epidermis) o los condrocitos (células que se encuentran en el cartílago). Es por esto que en tejidos como la piel y el cartílago, el ácido hialurónico se encuentra en grandes cantidades (55).

Este polímero es sintetizado naturalmente por las ácido hialurónico sintetasas. Se han identificado tres ácido hialurónico sintetasas transmembranales responsables de la producción del ácido hialurónico. Estas enzimas sintetizan las cadenas largas y lineales de polímeros de estructuras repetidas de disacáridos del ácido hialurónico alternando la adición del ácido glucurónico y la N-acetilglucosamina en la cadena utilizando azúcares nucleótidos activados (ácido UDP-glucurónico y UDP N-acetilglucosamina) como sustratos. Estas sintetasas se expresan durante la embriogénesis, en los procesos de respuesta frente a una herida, en la transformación neoplásica de tejidos y que pueden producir cadenas de ácido hialurónico de diferente longitud. Para la síntesis de ácido hialurónico, se adicionan monosacáridos a la cadena alterando la adición de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena (56).

1.4.2. Degradación del ácido hialurónico

La degradación del ácido hialurónico puede ocurrir por medio de reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Cuando la degradación ocurre por reacciones enzimáticas, el ácido hialurónico es degradado por las hialuronidasas las cuales son

glicosilhidrolasas que se encuentran tanto en procariotas como eucariotas. Existen tres tipos de enzimas que intervienen en la degradación del ácido hialurónico: la hialuronidasa, β -D-glucuronidasa y la β -N-acetil-hexosaminidasa. La hialuronidasa escinde el ácido hialurónico de alto peso molecular en fragmentos pequeños, mientras que las otras enzimas degradan los fragmentos removiendo los azúcares terminales no reductores. Las enzimas varían en propiedades, tamaño, mecanismos catalíticos, especificidad en diferentes sustratos, afinidad con inhibidores y su dependencia del pH (46).

La degradación del ácido hialurónico también puede ocurrir por mecanismos no enzimáticos como la hidrólisis ácida (degradando el fragmento del ácido glucurónico) o alcalina (degradando el fragmento del N-acetilglucosamina), la degradación ultrasónica, por estrés térmico o por medio de agentes oxidantes (57). Existen dos vías en el cuerpo que están comprometidas con el catabolismo: internalización y degradación dentro de los tejidos, y su liberación desde la matriz, drenaje en el sistema vascular y el aclaramiento en los ganglios linfáticos, el hígado y el riñón.

1.5. FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO

Los factores de crecimiento tienen un papel muy importante en las funciones madurativas, metabólicas y reparativas en las células. Forman parte del grupo de las citoquinas y actúan como mediadores endógenos intercelulares frente a diferentes estímulos provocando el desarrollo de las células mediante receptores específicos que reciben y transmiten señales para regular el crecimiento, la proliferación y el metabolismo de las células. Los factores de crecimiento son esenciales para el mantenimiento de las funciones cutáneas. La remodelación extracelular de la matriz de la piel es una de sus funciones más importantes (58).

Entre los factores de crecimiento se encuentra el factor de crecimiento epidérmico, el cual es un polipéptido de 53 aminoácidos formado por una sola cadena con un peso molecular de 6025 Da. Estimula el RNA mensajero, el DNA y la síntesis de proteínas en muchas células.

1.5.1. Historia del EGF

A comienzo de los años 50, la bióloga Rita Levi-Montalcini inició la búsqueda de factores de crecimiento con el descubrimiento del factor de crecimiento nervioso (proteína que promueve la diferenciación, crecimiento y supervivencia de muchas poblaciones de neuronas periféricas y del sistema nervioso central durante el desarrollo y la vida adulta). En 1953, Dr. Stanley Cohen se unió al grupo de investigación de Rita Levi-Montalcini y comenzó a trabajar con el factor de crecimiento nervioso y el aislamiento de factores de crecimiento en la glándula salival (59).

Durante estos estudios, se observó que ratones recién nacidos tratados con extracto de la glándula salival se desarrollaron más rápido que el grupo control. Esta observación llevó a pensar que los extractos de glándula salival contenían sustancias que promueven el crecimiento. Investigaciones posteriores en el grupo de Cohen llevaron al aislamiento del factor de crecimiento epidérmico a partir de las glándulas submandibulares murinas..

Con los trabajos de Rita Levi-Montalcini y de Stanley Cohen, se descubrió que las células comienzan a reproducirse cuando reciben una orden para hacerlo y esta orden es transmitida por los factores de crecimiento. Ambos investigadores comprobaron que estas sustancias actúan gracias a unos receptores de la membrana celular que catalizan la fosforilación de las proteínas, las cuales provocan la producción de ADN, dando lugar al

proceso de la división celular. Mediante estudios realizados con ratones se evidenció que el factor de crecimiento epidérmico es una sustancia capaz de acelerar el crecimiento y se le llamó así por su habilidad de estimular la proliferación de células epidérmicas murinas y de las células epiteliales de la córnea (60).

1.5.2. Propiedades del EGF

El factor de crecimiento epidérmico es un polipéptido de 53 aminoácidos con 6 residuos de cisteína que forman tres uniones disulfurointramoleculares esenciales para su actividad biológica como factor de crecimiento.

Luego de haber aislado el factor de crecimiento epidérmico, se siguieron realizando estudios para descubrir más propiedades biológicas y fisiológicas de éste. Se encontró que además de la glándula salival, este factor de crecimiento está en varios extractos de tejido y fluidos corporales (fluido amniótico, leche, saliva, contenido gástrico y duodenal, jugo pancreático, bilis y orina). El factor de crecimiento favorece la mitogénesis, el desarrollo y la implantación en diferentes especies mamíferas; también participa en el desarrollo embrionario y en la morfogénesis de muchos órganos como el cerebro, el tracto reproductivo, la piel y el tracto gastrointestinal. Además el factor de crecimiento epidérmico está implicado en la regeneración y citoprotección epitelial, trofismo tisular, la regulación de la supervivencia celular, la función cardíaca y acelera la curación de heridas. Los factores que influyen sobre sus efectos in vivo son la magnitud de su producción, su vida media, la distribución corporal y la presencia de inhibidores naturales (61).

Este factor de crecimiento se distribuye ampliamente en secreciones tisulares y fluidos y actúa a través de su afinidad con su receptor (receptor del factor de crecimiento epidérmico) induciendo la actividad de la tirosin-quinasa que inicia una cascada que resulta en una larga sucesión de cambios bioquímicos en toda la célula. Estos cambios bioquímicos se reflejan a nivel cutáneo promoviendo la proliferación de los queratinócitos, aumentando su adhesividad y movilidad, activando la función del fibroblasto, aumentando la producción de colágeno, ácido hialurónico y elastina de la matriz intercelular e induciendo angiogénesis.



Figura 9. Propiedades del factor de crecimiento epidérmico (62)

El receptor del factor de crecimiento epidérmico está constituido por tres segmentos o dominios: un dominio extracelular formado por 621 aminoácidos, un dominio transmembrana compuesto por 23 aminoácidos que anclan al receptor a la membrana y un dominio intracelular que contiene 542 aminoácidos y posee una porción con actividad enzimática capaz de introducir grupos fosfatos en otras proteínas y 4 sitios en que puede también ser fosforilada: una treonina y tres tirosinas (63).

1.5.3. Mecanismo de acción del EGF

En general los factores de crecimiento actúan inicialmente en el medio extracelular, uniéndose a receptores específicos de membrana que desencadenan complejas modificaciones de la maquinaria intracelular que acaban alterando la transcripción de determinados genes que activan el avance del ciclo. Los factores de crecimiento regulan el crecimiento de la célula de diferentes maneras: pueden facilitar la unión de otro factor diferente a su receptor, modificar el número de receptores para sí mismo o para otros factores o pueden modificar la síntesis y secreción de otro factor de crecimiento diferente. Por lo tanto, el efecto de un factor de crecimiento sobre la proliferación celular no sólo depende de su acción directa sobre las proteínas intracelulares que regulan el crecimiento y la proliferación de la célula, sino también de las interacciones que existen entre los diferentes factores de crecimiento (64).

Los factores de crecimiento actúan como primeros mensajeros a través de la vía de transducción de señales. En este proceso el ligando se une a un receptor de superficie de membrana específico que se encarga de transmitir la señal al interior celular y provocar

reacciones en cadena moleculares intracelulares. Estas señales se transmiten a través de una escalera de moléculas que son activadas y desactivadas en forma secuencial para provocar una respuesta celular. Es aquí cuando el factor de crecimiento epidérmico comienza a realizar su función mitogénica. Estos receptores son del tipo tirosin-quinasa y poseen un dominio externo fijador de ligandos, un dominio de anclaje transmembrana y un dominio interno que transmite las señales a la célula. Poseen especificidad en dos sentidos: tienen muy alta afinidad de unión por su ligando y se distribuyen por tejidos que están influenciados por la sustancia peptídica específica.

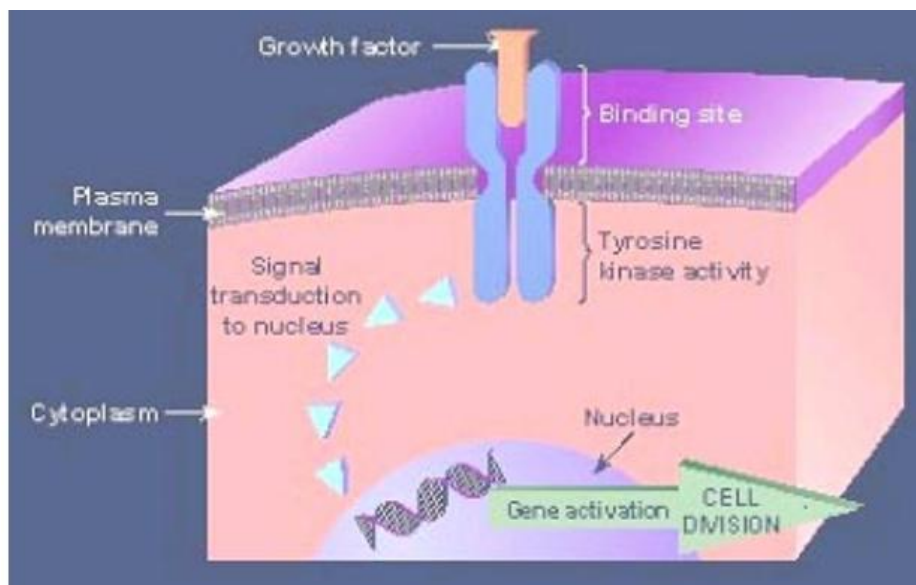


Figura 10. Mecanismo de acción de los factores de crecimiento

El factor de crecimiento epidérmico hace parte de un complejo de factores de crecimiento y receptores que ayudan a modular el crecimiento de las células. Es liberado por células y captado por la misma célula que lo liberó para estimular su propio crecimiento, o por células vecinas estimulando su capacidad para dividirse. El receptor del factor de crecimiento epidérmico se encuentra en la dermis, epidermis y pelo y tiene la capacidad de unirse en su superficie con la proteína, activándose al formar dímeros con otros receptores para liberar señales al interior de la célula. Este receptor se encuentra en la membrana celular y está compuesto por una cadena sencilla con una porción en la parte externa para recibir mensajes y otra porción en la parte interna para liberar los mensajes en la célula. La parte externa es la porción que se une a la proteína y está compuesta por cuatro partes articuladas que se encargan de atrapar a la proteína y

rigidizarlas por medio de los aminoácidos de cisteína. Cuando la proteína se une a la porción externa del receptor, la forma de éste cambia y comienza a liberar secciones ricas en cisteína lo cual permite que el receptor forme dímeros con otros receptores. La parte interna del receptor es una enzima tirosin-quinasa y cuando el receptor forma el dímero, las quinazas adicionan grupos fosfato a los residuos de tirosina de la cadena vecina activando el receptor. Las proteínas de señalización que están dentro de la célula se unen a estas nuevas tirosinas fosforiladas iniciando la cascada de señalización que a su vez inicia la síntesis de DNA y de crecimiento celular (65).

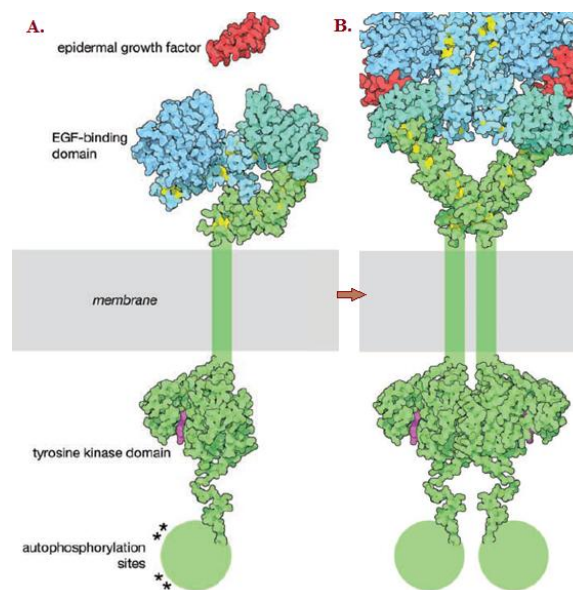


Figura 11. Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

1.5.4. Aplicaciones del EGF

Desde hace algunos años se están realizando estudios experimentales clínicos que se centran en las propiedades cicatriciales de los diferentes factores de crecimiento. Dentro de estos estudios, se ha visto que la piel tiene la capacidad de expresar una gran variedad de factores de crecimiento e importantes receptores para éstos. Se ha visto la importancia del factor de crecimiento epidérmico al intervenir en el crecimiento del epitelio hacia la superficie de la herida. Un péptido similar al factor de crecimiento epidérmico es el factor de crecimiento transformante-alfa (TGF-alfa) que es expresado por los queratinocitos epidérmicos y también por otros epitelios como los de la mucosa oral, glándula mamaria y gastrointestinal. Este factor tiene acciones similares, ya que incluso ambos se ligan y se unen al mismo receptor, no solo de los queratinocitos, sino

también de las células de los apéndices epiteliales, músculo liso y otros tipos de células mesenquimales (66). El factor de crecimiento actúa sobre numerosos órganos y tejidos: ojos, mamas, tracto gastrointestinal, hígado, riñón, nervios periféricos, y piel. Uno de los campos de estudio más llamativos del factor de crecimiento epidérmico, es su efecto tópico sobre la reparación tisular en casos de quemaduras y heridas; numerosos estudios han demostrado la capacidad de regeneración celular de este factor de crecimiento. Gracias a sus importantes propiedades, el factor de crecimiento epidérmico tiene diferentes campos de aplicación como la dermatología, traumatología, cirugía plástica, entre otros (67). Se ha visto que regula la función celular en los cambios producidos por los queratinocitos, lo que contribuye a la renovación y reparación epidérmica; aumenta la consistencia elástica de la piel y su hidratación por el aumento de ácido hialurónico de la matriz intercelular al activar la función del fibroblasto; indirectamente tiene acción antioxidante al incrementar la enzima superóxido de dismutasa; activa los sistemas de membrana calcio dependientes mejorando el sistema de transporte de macromoléculas e iones al interior celular (68). Una amplia variedad de células mesenquimales (MSC) normalmente expresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La evidencia emergente sugiere que EGF funciona como un potenciador de la mineralización durante la diferenciación de MSC derivadas de la médula ósea. EGF desempeña un potencial papel en la diferenciación osteogénica de las células madre de pulpa dental (DPSC) porque es capaz de aumentar la mineralización de la matriz extracelular. Una baja concentración de EGF (10 ng / ml) es suficiente para inducir cambios morfológicos y fenotípicos (69).

1.5.5. EGF en tejidos periodontales

El epitelio oral es una barrera protectora crítica para la infección por microbios patógenos. Se mantiene la función barrera del epitelio a través de ciclos de proliferación y diferenciación celular por los cuales las células epiteliales se retiran periódicamente del ciclo celular y terminalmente diferenciarse a medida que migran hacia la superficie del epitelio (70). Señalización por receptores del factor de crecimiento, incluido el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) es importante para mantener el equilibrio homeostático entre la proliferación y diferenciación de células epiteliales orales (68). También contribuyen a la función de barrera al producir péptidos antimicrobianos (71). Por ejemplo, las β -defensinas humanas, hBD1 y hBD2, que se

expresan diferenciando células epiteliales en las capas suprabasales del epitelio gingival son activas contra un rango de bacterias y hongos (72). Las células epiteliales orales también median la defensa del huésped al desencadenar inflamación en respuesta a los patógenos microbianos. Esto se logra a través de la activación de receptores de reconocimiento de patógenos (PRR), que incluyen Receptores tipo Toll (TLR) y receptores activados por proteasas (PAR) (72). Las quimiocinas son importantes mediadores de las respuestas inflamatorias activadas por los PRR. Interleucina 8 (IL - 8) y quimiocina (motivo C-X-C) ligando 1 (CXCL1) estimulan reclutamiento de neutrófilos, mientras que la quimiocina (motivo C-C) ligando 2 (CCL2) estimula el reclutamiento de monocitos y macrófagos. Estas células inmunes innatas pueden amplificar la respuesta inmune produciendo quimiocinas adicionales, incluidos CCL5 y CXCL10, que reclutan células inmunes adaptativas, tales como los linfocitos (73). Es importante destacar la expresión de las quimiocinas por epitelio las células también están reguladas por otros receptores, incluido el receptor EGF. En consecuencia, la señalización de múltiples receptores las vías contribuyen a la expresión coordinada de quimiocinas por células epiteliales. Además de estimular el reclutamiento de células inmunes, algunos tienen actividades antimicrobianas directas. CCL20 y CCL28, por ejemplo, han demostrado tener actividad antimicrobiana contra una amplia gama de agentes patógenos, que incluyen Bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, así como hongos. Una característica común de las quimiocinas con actividad antimicrobiana parece ser la presencia de un gran parche electrostático de superficie cargado positivamente, que induce la lisis de las membranas celulares, lo que resulta en la muerte celular microbiana. La *Porphyromonas gingivalis* es un patógeno clave en la periodontitis crónica, una enfermedad inflamatoria donde la desregulación del huésped y la inflamación causa la descomposición de los tejidos periodontales (74). *P. gingivalis*, que coloniza el exterior de las capas de una biopelícula subgingival polimicrobiana, expresa factores de virulencia que le permiten subvertir la respuesta inmune del huésped. En particular, las proteasas de gingipaína (Kgp y RgpA / B) pueden degradar las citocinas y quimiocinas (por ejemplo, IL-6 e IL-8), así como péptidos antimicrobianos (p. ej., β -defensinas) (75). Las proteasas de gingipaína también pueden desregular respuesta inmune estimulando la señalización cruzada entre TLR, quimiocinas receptores y receptores del complemento. Es importante destacar que la desregulación de la respuesta inmune también interrumpe la homeostasis que

normalmente existe entre el huésped y la biopelícula subgingival, lo que resulta en la disbiosis de la biopelícula y el desarrollo de periodontitis crónica (76). La señalización por los receptores del factor de crecimiento, incluido el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), es importante para mantener el equilibrio homeostático entre la proliferación y diferenciación de las células epiteliales (68). Las células epiteliales orales también contribuyen a la función de barrera al producir péptidos antimicrobianos (77). *Porphyromonas gingivalis* es un patógeno clave en la periodontitis crónica, una enfermedad inflamatoria en la que la desregulación de la inflamación del huésped causa la degradación de los tejidos periodontales (78). La respuesta inflamatoria iniciada en el epitelio oral es importante para establecer la defensa del huésped contra la infección por *P. gingivalis*. Se estudió recientemente que la expresión del gen CXCL14 en queratinocitos epidérmicos está inhibida por la señalización de EGF. Además, se ha demostrado que *P. gingivalis* antagoniza la señalización de EGF en fibroblastos epidérmicos (79). EGF regula la expresión de CXCL14 en células OKF6 (células epiteliales orales). Se encontró que la señalización inducida por EGF reprime transcripcionalmente la expresión de CXCL14, y por lo tanto, la degradación mediada por Gingipain proteasa de EGF es probablemente importante para la estimulación de la expresión de CXCL14 por *P. gingivalis*. Además, los datos indican que CXCL14 puede matar directamente *Streptococcus sp oral*. Sin embargo, *P. gingivalis* no fue susceptible de ser destruido por CXCL14, probablemente porque puede degradar proteolíticamente CXCL14. En consecuencia, la estimulación de la expresión de CXCL14 desregulada por *P. gingivalis* podría promover la disbiosis. La estimulación de la expresión de CXCL14 por *P. gingivalis* también implica la degradación mediada por gingipaina proteasa del factor de crecimiento epidérmico (EGF), que alivia la represión transcripcional de CXCL14 por la vía MEK-ERK1 / 2 (72).

1.6. ELETROPORACIÓN

Durante los últimos años los científicos han desarrollado técnicas que facilitan la absorción mediante la perturbación de la función barrera de la piel de forma reversible, todo ello sin fractura ni irritación y sin afectar a la salud de la piel. Dentro de estas técnicas han alcanzado cierto éxito la eletroporación. Este procedimiento aparece por primera vez en el campo de la biología molecular como forma de introducción de diferentes sustancias en células, como por ejemplo sondas moleculares, un fármaco que puede cambiar las funciones celulares o un fragmento de DNA codificante. Se basa en un significativo aumento de la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana plasmática celular causado por un campo eléctrico aplicado externamente. Cuando el voltaje que atraviesa una membrana plasmática excede su rigidez dieléctrica se forman poros. Si controlamos la fuerza del campo eléctrico aplicado y/o la duración de la exposición al mismo, los poros formados por el pulso eléctrico se sellan tras un corto periodo de tiempo, durante el cual los compuestos extracelulares tienen la oportunidad de entrar a la célula. A través de pulsos de alto voltaje, se ocasiona una perturbación de la capa fosfolipídica de las membranas celulares (80). Los pulsos eléctricos provocan un potencial transmembrana entre 0.5-1 V, con una duración entre 10 microsegundos y 10 milisegundos, estos pulsos están condicionados por la modalidad de la onda (cuadrada y/o exponencial), el voltaje aplicado (50-1500 V) y el intervalo entre pulsos (segundos o minutos). Los modelos teóricos que explican estos cambios en las propiedades de las membranas asociados con la aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje, indican también la creación de poros o rutas acuosas. En biología molecular, la electroporación se ha usado habitualmente para la transformación de bacterias, levaduras y protoplastos vegetales. Las bacterias poseen una pared celular compuesta de péptidoglicanos y sus derivados, además de la membrana lipídica presente en todas las células. Esta pared celular es porosa por naturaleza y su misión es la de actuar como barrera protectora de tipo mecánico. Al mezclar bacterias y plásmidos, con eletroporación los plásmidos pueden transferirse al interior de las células. En este proceso suelen emplearse varios cientos de voltios, que atraviesan una distancia de varios milímetros. Estas células con el plásmido introducido son manipuladas produciendo su división, obteniendo de este modo nuevas células que contienen copias del plásmido (81). También se ha utilizado la eletroporación para la introducción de genes externos en células en cultivo, especialmente en las de mamífero (por ejemplo, en

procesos de producción de ratones knockout, terapia génica, terapias basadas en células, etc. En la década de los 90, esta técnica comienza a ensayarse para la administración transdérmica de distintos principios activos, en patologías inflamatorias, tratamientos del dolor, e incluso en neoplasias humanas (80).

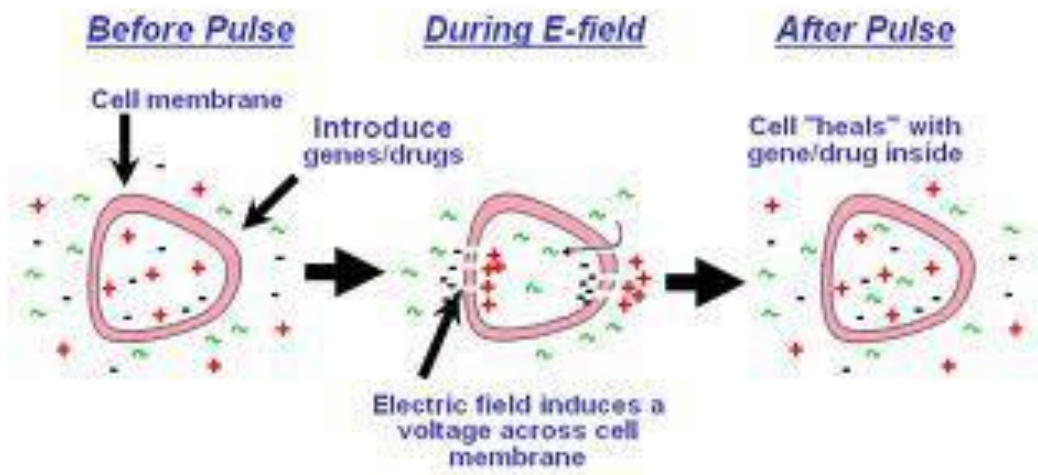


Figura 12. Eletroporación

-Con esta técnica se consigue incrementar el proceso de difusión pasiva por el que se transporta el principio activo a través de la piel (sobre todo a nivel del estrato córneo, que como sabemos es la principal barrera que limita la absorción por esta vía), por un lado con la apertura a nivel de la membrana semipermeable de poros acuosos reversibles debido a la incidencia a este nivel de una cantidad de energía controlada, por otro lado se producen fenómenos de fluidificación en la bicapa lipídica de la membrana que permiten un paso más elevado de sustancias con un coeficiente de partición y una lipofilia en principio poco adecuadas para su paso a través de ella.

- En el caso de los electrolitos, muy utilizados en la vía transdérmica, ya sean bases débiles o ácidos débiles, el paso del medio lipídico al medio acuoso una vez dentro de la membrana, sabemos que se realiza obedeciendo únicamente a un gradiente de concentración con un mecanismo que cumple la Ley de Fick, de manera que la absorción se lleva a cabo hasta que se obtenga el estado de equilibrio a ambos lados de la membrana. Con el efecto eléctrico conseguimos que los electrolitos entren en resonancia y alcancen niveles vibracionales que facilitan su tránsito a través de la membrana, alcanzándose más rápidamente el estado de equilibrio y aumentando de este modo su absorción.

-Cuando se administra una forma farmacéutica por vía transepidermica, ya sea esta una pomada, crema, gel o una emulsión líquida, el transporte se lleva a cabo por una serie de etapas en cada una de las que se forma una interfase a través de la cual se cumple la secuencia de liberación, penetración, permeación y absorción según sea el objetivo que se busque. Esa secuencia puede ser modificada por medio de la formulación; con la técnica de Introducción Transdérmica Digital actuamos a nivel de la técnica de administración acelerando el proceso de penetración, permeación y absorción en las distintas interfases, y por tanto el proceso global.

-Una vez que el principio activo ha difundido a través del estrato córneo y las demás capas de la epidermis, tiene efectos a nivel de las membranas plasmáticas celulares, algunos de los cuales comentamos a continuación:

i. En los canales iónicos (poros hidrofílicos formados por proteínas que permiten el paso de iones), las proteínas de canal son capaces de adoptar diversos estados conformacionales dependiendo del potencial celular. En general, existe un estado conductor (estado abierto, que permite el paso de iones a su través) y dos no conductores (estado inactivo y de reposo).

A nivel del potencial de reposo celular, la probabilidad de apertura de los canales es mínima. La despolarización celular aumenta la probabilidad de apertura del canal, pero si la despolarización se mantiene, la probabilidad de apertura disminuye como consecuencia del proceso de inactivación iniciado simultáneamente por el de activación; así el canal pasa al estado inactivo-cerrado desde el cual no puede volver a abrirse. Para que el canal vuelva a abrirse es necesario que el canal inactivado pase al estado de reposo (proceso de reactivación del canal). Distintos estudios parecen indicar que el aporte de energía modulada que realizamos con el equipo, genera un estímulo a nivel de membrana que actúa activando la despolarización celular en pulsos de tiempo infinitesimales que aumentan la apertura de algunos tipos de canales iónicos (canales de k^+ voltaje-dependientes, canales de cloro).

ii. En otros tipos de canales iónicos (canales de calcio), la energía aportada parece actuar en mayor medida en los procesos de reactivación del canal.

iii. También actúa a nivel de canales catiónicos inespecíficos, que permiten el paso de todos los iones positivos (sodio, potasio, calcio) y excluyen a los negativos, en estos canales se acentúa la despolarización que produce su apertura, ya que la energía con la que incidimos consigue una entrada neta de cargas positivas en la célula, tendiendo de este modo el potencial de membrana a 0 mv, que está aproximadamente en el punto medio entre el potencial de equilibrio del sodio y del potasio.

iv. El transporte activo a través de la membrana mediante proteínas transportadoras (proteínas transmembrana que poseen multitud de hélices alfa inmersas en la matriz lipídica y que se unen a la sustancia a un lado de la membrana y la transportan al otro lado donde la liberan) se efectúa en contra del gradiente de concentración o electroquímico y, para ello las proteínas implicadas consumen energía metabólica (comúnmente ATP). La energía que genera el equipo actúa facilitando la hidrólisis del ATP, poniendo a disposición de la proteína una mayor cantidad de energía metabólica y por tanto optimiza el proceso de transporte.

v. En el caso de las bombas, proteínas que hidrolizan ATP para transportar a través de una membrana un determinado soluto a fin de generar un gradiente electroquímico que confiere características de potencial. El gradiente electroquímico que se crea interviene activamente en el transporte de sustancias a través de la membrana, la energía con la que incidimos, aporta un aumento de entropía adicional al sistema, que facilita el cotransporte de sustancias que se encuentran en trasiego en contra de su gradiente. La bomba de mayor relevancia donde se han visto los efectos es la bomba sodio-potasio presente en todas las células. Podemos concluir este apartado, indicando de forma resumida que:

La **eletroporación** es una alternativa no invasiva a la mesoterapia convencional. Consiste en la emisión de una onda electromagnética pulsada atómica y no ionizable con la finalidad de producir una alteración en el potencial de membrana. Esta alteración provoca una electrorotación de los lípidos con la consiguiente apertura momentánea de los poros de la membrana celular para el ingreso de sustancias en su interior. Es un proceso que tiene la particularidad de ser reversible y transitorio debido a la característica de la corriente: pulsada y no constante. Por lo tanto, tendremos un significativo aumento de la conductividad eléctrica y de la permeabilidad de la membrana plasmática. Cuando el voltaje que atraviesa una membrana plasmática

excede su rigidez dieléctrica se forman poros, que tras un corto periodo de tiempo (durante el cual los compuestos extracelulares tienen la oportunidad de entrar a la célula), se cierra; además gracias a estos equipos y sin necesidad de agujas, se consigue hacer penetrar altas concentraciones de principios activos purificados en las capas intermedias de la piel, obteniéndose un gran aporte de sustancias de manera controlada en zonas muy delimitadas.

1.7. FORMULACIONES TÓPICAS

Para el diseño de formulaciones farmacéuticas y cosméticas, se debe tener conocimiento en varias ramas (física, química, ingeniería, bioquímica y tecnológica) y también se debe tener un amplio grado de información en la funcionalidad de los compuestos utilizados, las interacciones entre los componentes de la fórmula, los requerimientos en los asuntos regulatorios, procesos biofarmacéuticos y posibles interacciones entre los componentes, la actividad funcional y los riesgos que todo ello puede ocasionar. El objetivo principal en el desarrollo de una formulación es asegurar que sus ingredientes activos sean biodisponibles, seguros, estables, libres de microorganismos y que permitan que el preparado sea fácil de utilizar para así conseguir mayor adherencia del paciente o cliente (82).

Existen algunos factores principales que el farmacéutico debe considerar en el momento de formular o diseñar un producto de aplicación y acción en la cavidad bucal. Estos factores son: elección del principio activo y de los excipientes adecuados, elección de la forma farmacéutica y consideración de los efectos del vehículo. Los vehículos deben poseer unas características farmacotécnicas que dependen de las condiciones de utilización concreta como por ejemplo el objetivo terapéutico de la formulación, la naturaleza de las lesiones o afecciones a tratar y las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los principios activos que incorporan. En general, cuando se está realizando la formulación de un producto para administración por vía tópica mucoadhesiva se debe tener en cuenta el pH ya que debe ser lo más parecido al de la zona donde se va a administrar, en este caso la cavidad bucal en la que los compuestos a administrar de ben tener un pH neutro o débilmente ácido, alrededor de 5.6-7, la estabilidad física y química, la compatibilidad entre los principios activos que la incorporan, las propiedades reológicas para que haya una adecuada extensibilidad y adaptabilidad a la superficie, las propiedades organolépticas, no deben producir alergias ni irritaciones al aplicarlo. Uno de los principales factores a considerar a la hora de desarrollar una formulación, es reducir el número de componentes y así disminuir el riesgo que alguno de ellos puede causar. Es por esto que un estudio de formulación es una fase crítica, dado que el formulador deberá prescindir de toda una serie de recursos para lograr una mejor compatibilidad del preparado (83).

1.7.1. Formulación bucal localizada

El término adhesión aparece definido en el diccionario de la RAE como: “Acción y efecto de adherir o adherirse”. Esta definición hace referencia de manera escueta al proceso por el cual dos superficies establecen interacciones moleculares que permiten generar fuerzas atrayentes entre ambas, resultando en el fenómeno de la adhesión. Respecto a la mucoadhesión en el ámbito galénico, se puede definir como el proceso que implica la generación de interacciones entre una forma farmacéutica y una mucosa del organismo, estas interacciones permiten la fijación semipermanente de dicha forma farmacéutica a la mucosa. Es a principios de los años 80 cuando el concepto de mucoadhesión empieza a generar verdadero interés en el desarrollo de formulaciones más novedosas. Hasta la actualidad, sigue suponiendo un campo de innovación y desarrollo debido a las ventajas que ofrecen, destaca de entre ellas la capacidad de permanecer en la mucosa diana durante un mayor periodo de tiempo que otras formas farmacéuticas más clásicas. Este aumento de la permanencia en el lugar de acción o absorción mejora la biodisponibilidad y características tanto farmacocinéticas como farmacodinámicas de muchos principios activos, potenciándose su efecto local o sistémico. Otra ventaja destacable es la posibilidad de poder ser formuladas para que presenten cierta especificidad por un tejido mucoso en particular (84).

1.7.2. Mucosas: aspectos generales a tener en cuenta para formular

El término mucosa se designa a la capa epitelial que recubre las paredes internas de determinados órganos (p.e: estómago) y cavidades externas (p.e: boca). Tiene funciones secretoras, absorptivas y protectoras frente a agresiones tanto mecánicas (acción lubricante) como químicas. La estructura se basa en un epitelio externo en contacto directo con la luz del órgano o cavidad caracterizado por presentar capas celulares con estrechas uniones intercelulares así como presencia de células calciformes, responsables de la secreción de mucus. Subyacente a esta capa se encuentra la lámina propia, un estrato de tejido conectivo seguido de otro altamente vascularizado, presenta función de soporte al epitelio superior y contiene células secretoras, tejido linfóide y una gran variedad de células inmunológicas. Ciertos tejidos mucosos como el del estómago e intestino poseen una tercera capa compuesta por músculo liso y con función fundamentalmente locomotora del tejido adyacente. Si algo tienen en común las distintas mucosas del organismo es la presencia de “mucus”, un fluido viscoso y

translúcido que se adhiere a la superficie del epitelio externo permitiendo la lubricación y protección adecuada del tejido. El mucus es producido mayoritariamente por glándulas secretoras de células calciformes, como las células de Goblet, que están presentes en la mayoría de mucosas del tracto digestivo y respiratorio. Está compuesto principalmente por agua (95%) y minoritariamente por otros elementos como proteínas, lípidos, aminoácidos y sales inorgánicas, además de elementos específicos de cada mucosa. Sin duda, los componentes más destacados son las mucinas: glicoproteínas de elevado peso molecular (500000 g/mol/unidad funcional) que poseen una estructura basada en un esqueleto peptídico de aproximadamente 800 aminoácidos rico en prolina, treonina y serina; estas dos últimas, gracias a la presencia de grupos hidroxilo se encuentran unidas a cadenas laterales de oligosacáridos. Destaca en la composición de estas ramificaciones la presencia de: N- acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, galactosa, fucosa y ácido siálico; este último presenta restos sulfuro en su estructura que condicionan el carácter polianiónico de las mucinas a pH neutro. Las mucosas dotadas de interés en el uso de formulaciones mucoadhesivas serán la bucal, vaginal, ocular, nasal, gastrointestinal y rectal. Cada mucosa es diferente tanto en su composición como en su entorno y características, lo que determina que cada una presente una serie de ventajas y limitaciones (85).

1.7.3. Mucoadhesión

Varias vías de administración, como ocular, nasal, bucal y gingival, gastrointestinal (oral), vaginal y rectal, hacen que los sistemas de administración de fármacos mucoadhesivos sean atractivos y flexibles en el desarrollo de formas de dosificación. La mucoadhesión se define como una interacción atractiva en la interfaz entre una forma de dosificación farmacéutica y una membrana mucosa. Los sistemas de administración de fármacos mucoadhesivos pueden formularse como comprimidos, inserciones sólidas, geles, soluciones viscosas, suspensiones de micropartículas y nanopartículas, sistemas de gelificación in situ y aerosoles. La mayoría de estas formas de dosificación incorporan excipientes poliméricos, que desempeñan un papel importante en su mucoadhesividad. Algunos polímeros mucoadhesivos no solo pueden aumentar el tiempo de residencia de la forma de dosificación en el sitio de administración, sino que también pueden aumentar la permeabilidad del fármaco a través del epitelio al modificar las uniones estrechas entre las células. La mucoadhesividad de las formas de

dosificación generalmente se logra mediante el uso de polímeros hidrófilos en formulaciones, que a menudo demuestran una buena capacidad para adherirse a las membranas mucosas (83).

El rendimiento mucoadhesivo excelente se observa típicamente para polímeros que poseen grupos cargados o grupos funcionales no iónicos capaces de formar enlaces de hidrógeno con las superficies de la mucosa. Algunas de las características estructurales poliméricas necesarias para la mucoadhesión se pueden resumir de la siguiente manera: (i) grupos de enlace de hidrógeno fuerte, por ejemplo, grupos carboxilo, hidroxilo, amino y sulfato, (ii) cargas aniónicas o catiónicas fuertes, (iii) alto peso molecular, (iv) flexibilidad de la cadena, (v) propiedades de energía superficial que favorecen la propagación sobre el moco (86).

Los polímeros mucoadhesivos se clasifican según los grupos químicos funcionales. Los polímeros aniónicos incluyen caboximetilcelulosa y carbopol con grupo carboxílico. La bioadhesión de polímeros aniónicos se lleva a cabo mediante enlaces de hidrógeno entre el grupo carboxílico y las cadenas de oligosacáridos de glucoproteínas mucosas llamadas mucinas. Los polímeros no iónicos como la hidroxipropilmetilcelulosa formaron una capa de interpenetración con moco. Estos polímeros se unen débilmente que los aniónicos, por lo tanto, se combinan para favorecer el efecto deseado (87).

TEJIDO	LOCALIZACIÓN	ESPESOR (μm)	QUERATINIZACIÓN	NATURALEZA DE LOS LÍPIDOS
Bucal (50 cm^2)	Interior de las mejillas y de los labios superior e inferior	500 - 600	No	Polar
Sublingual (26.5 cm^2)	Frenillo y base de la boca	100 - 200	No	Polar
Gingival	Encías	200	Sí	Apolar
Palatal	Paladar superior y lengua	250	Sí	Apolar

Tabla 5. Superficies y características zona bucal (88)

La mucosa bucal cubre el interior de la mejilla, así como un área entre las encías y los labios superiores e inferiores y tiene una superficie promedio de 50 cm^2 . La mucosa tiene la función de proteger los tejidos subyacentes del daño mecánico y químico. La anatomía del sitio bucal consta de tres tipos de mucosa: el revestimiento de la membrana mucosa que se encuentra fuera del vestíbulo oral, la región sublingual y la mucosa especializada. Las mucosas queratinizadas presentes en el paladar duro y gingival no se consideran un sitio para la administración sistémica y son lugares útiles

para el suministro local de fármacos en el tratamiento de enfermedades orales localizadas en la encía o el paladar (83).

La bioadhesión se puede definir como el estado en el que dos materiales, al menos uno de los cuales es biológico, se mantienen unidos durante un período prolongado de tiempo por fuerzas interfaciales. Los sistemas bioadhesivos aplicados a las membranas mucosas a menudo se definen como mucoadhesivos, pero el uso de estos términos puede ser intercambiable. El mecanismo de adhesión de ciertas moléculas en la superficie de un tejido o mucosa aún no se conoce bien. La forma farmacéutica mucoadhesiva debe extenderse sobre el sustrato para iniciar un contacto con la superficie, promoviendo la difusión de sus cadenas en el moco. Las fuerzas de atracción y repulsión surgen, y para la aparición de la mucoadhesión, debe haber un predominio de las fuerzas de atracción. Por lo tanto, el proceso de mucoadhesión generalmente se divide en dos etapas. La primera de ellas se caracteriza por el contacto entre el material y la membrana mucosa, donde ocurrirá la propagación y el hinchamiento de la formulación, iniciando un contacto con la capa de moco. En la siguiente fase de consolidación, los materiales mucoadhesivos inician una interacción molecular con el moco mediante fuerzas de van-der-Waals o enlaces de hidrógeno (89).

1.7.4. Formulaciones de administración bucal, sublingual y gingival

Aunque tenga una superficie muy limitada de aproximadamente 50 cm², esta región se caracteriza por ser cómoda y controlable debido a su fácil acceso, presentar una adecuada vascularización y permeabilidad así como un escaso contenido de enzimas degradativas. Todas estas características la convierten en una buena diana para una formulación mucoadhesiva, especialmente aquellas cuyos principios activos sufren de notables pérdidas sistémicas por efecto de primer paso hepático o degradación enzimática, ya que se evita esta problemática. El epitelio de la mucosa bucal es poliestratificado, similar a los restantes órganos. Está formado por una membrana basal mitóticamente activa, sobre la que se sitúan capas de células progresivamente diferenciadas que se descaman en la zona más superficial. El recambio del epitelio bucal, es decir, la migración de una capa hasta la superficie, dura unos 5-6 días, y éste se puede considerar también como un valor promedio para toda la mucosa bucal. La composición de esta capa varía de acuerdo con las funciones del tejido; así en el paladar duro y la lengua, que son mucosas masticatorias sujetas a fuerzas de

distensión, el epitelio se encuentra queratinizado como la epidermis, mientras que el recubrimiento del interior de las mejillas y de la región sublingual es distensible y no queratinizado. Independientemente del grado de queratinización de la mucosa oral, esta no posee un estrato córneo propiamente dicho por lo que es mucho más permeable que la piel, de 4 a 4000 veces más permeable (89). La barrera de difusión de fármacos en la mucosa oral se debe principalmente al contenido lipídico de las capas superficiales del epitelio. Estos lípidos son secretados al medio intercelular en forma de desmosomas y gránulos membranosos, asegurando así la cohesión del epitelio (88). La composición de estos lípidos es aproximadamente 76% de fosfolípidos, 23% de glucoesfingolípidos y un 0.7% de ceramidas. La permeabilidad media de la mucosa bucal, considerada globalmente, es intermedia entre la percutánea y la intestinal. Evidentemente, debido a las estructuras y funciones de sus partes, existen diferencias considerables en su permeabilidad. Así, en principio, cabría establecer el orden decreciente: sublingual > bucal > palatal > gingival pues la mucosa sublingual es la más delgada, la bucal es más gruesa y la palatal y gingival se encuentran queratinizadas. En todo caso, la absorción parece que se realiza mayoritariamente por difusión pasiva entre la fase acuosa, constituida por la saliva, y la fase lipófila, que es la capa lipídica de la membrana. Se absorben bien una gama de compuestos con un coeficiente de reparto (aceite/agua) entre 40 y 2000. Las moléculas más hidrófilas son demasiado polares y sólo penetran en la mucosa al dosificarlas en altas concentraciones. Si la lipofilia sobrepasa el valor de 4000, los compuestos tienen una solubilidad demasiado baja en agua; la absorción de estos compuestos está limitada por su velocidad de disolución. La mucosa bucal es de interés para diseñar una formulación mucoadhesiva con liberación prolongada del activo, apta tanto para la absorción sistémica de éste como para un efecto local; mientras que la mucosa sublingual es idónea para una formulación de liberación rápida, por lo tanto no sería adecuada como diana en formulaciones mucoadhesivas. La mucosa gingival tiene aplicaciones en el desarrollo de formulaciones anestésicas mucoadhesivas, de aprovechamiento en procedimientos odontológicos. El equilibrio fase acuosa fase oleosa es lo que determina el grado de difusión de los principio activo en la mucosa gingival.

1.7.5. Polímeros mucoadhesivos: aspectos generales

La selección de los excipientes poliméricos supone la piedra angular para diseñar un sistema mucoadhesivo que interaccione correctamente con la mucosa diana. En términos generales, un polímero mucoadhesivo ideal será: biocompatible, biodegradable, no tóxico ni irritativo, apto para incorporar la dosis de principio activo oportuna, capaz de adherirse por enlaces semipermanentes de forma rápida y específica a la mucosa diana, resistente a la degradación tanto en su almacenamiento como a lo largo de su vida útil y asequible económicamente. Los polímeros que presentan buenas propiedades adhesivas suelen reunir una serie de características moleculares como: conformación espacial adecuada, elevado peso molecular, presencia de grupos funcionales capaces de formar enlaces por puentes de hidrógeno, cadenas flexibles, carga electrostática adecuada y propiedades de tensión superficial adecuadas que permitan el correcto humedecimiento y plastificación del sistema. La biocompatibilidad y biodegradabilidad suponen dos de los aspectos más importantes a la hora de seleccionar un polímero mucoadhesivo. La primera engloba la capacidad del polímero de interactuar adecuadamente con el medio biológico en el que se encuentra, sin generar toxicidad ni efectos indeseables en éste. Estrechamente ligado a este concepto se encuentra el de biodegradabilidad, por el cual el material es descompuesto en estructuras más elementales que pueden ser asimiladas y/o eliminadas del organismo por vías metabólicas normales. La capacidad de biodegradación de un polímero depende de factores tales como: su estructura, composición química, presencia de grupos iónicos, peso molecular, morfología, homogeneidad de las unidades poliméricas y procesos a los que ha sido sometido (90).

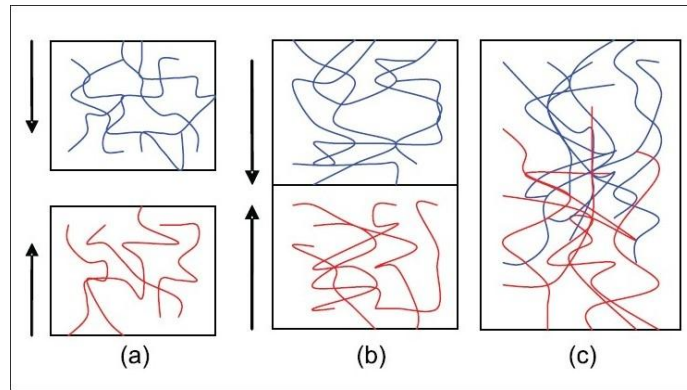


Figura 13. Representación esquemática de la teoría de la difusión de la bioadhesión. Capa de polímero azul y capa de moco roja antes del contacto; (b) Al contacto; (c) La interfaz se vuelve difusa después del contacto por un período de tiempo (91)

2. HIPOTESIS

La terapia mecánica no quirúrgica es la piedra angular del tratamiento periodontal.

Nos preguntamos si la aplicación del ácido hialurónico, solo o con coadyuvante como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), podría ayudar en el proceso de reparación y cicatrización de tejidos periodontales, produciendo el cierre de los llamados agujeros negros ("*black holes*")

Ante estos hechos, nuestra hipótesis de trabajo está basada en una serie de preguntas, que de una u otra forma intentaremos resolver mediante el trabajo de investigación que se realiza en esta Tesis Doctoral. Las preguntas que nos formulamos son:

1. La aplicación de ácido hialurónico ha tenido éxito en la manipulación y aceleración del proceso de cicatrización de las heridas en una serie de disciplinas médicas como la oftalmología, dermatología, y la reumatología. ¿La aplicación del ácido hialurónico solo o con coadyuvantes inyectado y/o eletroporado ayudará a los procesos de reparación y cicatrización de tejidos periodontales, produciendo un aumento del nivel de la cresta ósea alveolar y del epitelio en las bolsas periodontales?
2. ¿La aplicación de una formulación de HA solo o con coadyuvantes y aplicado por electroporación ayudará en el proceso de regeneración y de relleno de los triángulos negros?
3. En base a estas preguntas se perfilaron los objetivos del presente trabajo.

3. OBJETIVOS

El **objetivo** de este trabajo de tesis doctoral es desarrollar un producto destinado al tratamiento de las enfermedades periodontales, concretamente la retracción gingival de cualquier etiología y mejorar la estética de la zona periodontal. Tanto bolsas periodontales causadas por la periodontitis como triángulos negros de naturaleza estética causados bien por una periodontitis estabilizada y/o bien por implantes. De esta forma pretendemos mejorar la calidad de vida (mental y física) de los afectados por estos problemas. Hay que tener en cuenta que para la retracción gingival no existe un tratamiento eficaz que no sea la alternativa quirúrgica.

Así pues, podemos indicar que el:

Objetivo General es: Obtener un crecimiento gingival en espacios interdentarios, los llamados "Black holes".

Para su consecución, los objetivos específicos serán:

- Conseguir que un producto con la composición adecuada pueda aplicarse en defectos gingivales y estimulen el crecimiento de tejido.
- Diseñar y preparar una formulación que permita una dosificación y absorción adecuadas para el paciente con defecto gingival.
- Utilizar Acido Hialurónico y factor de crecimiento como arma terapéutica, reduciendo el número de intervenciones quirúrgicas con injertos de tejido autólogo o heterólogo.
- Realizar todos los ensayos que se consideran adecuados para una perfecta utilización del producto.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

El ácido hialurónico utilizado en todas las formulaciones fue suministrado por Fagron. El factor de crecimiento epidérmico utilizado en este trabajo es una proteína vehiculizada en tampón fosfato a pH 7.4 suministrado por Cell Signaling para Inves Biofarm. Además de una solución oleosa de EGF patentada por Inves Biofarm. ES 2502691B1 (92).

Para la elaboración de las distintas formulaciones se utilizaron los siguientes excipientes: Tween 80 y Span 80, Goma Xantana, Hipromelosa, Glicerol, Carbopol, Ácido cítrico, Sorbitol 70%, Ácido etilendiamintetraacético (EDTA) todos ellos suministrados por (Fagron); Complejo para la formación de liposomas (Lyposystem complex®) (Biophyl); Povidona, y Carboximetilcelulosa (Guinama), Propanediol (DKSH) y Citrato sódico y Benzoato sódico (Metapharmaceutical). En todos los desarrollos se utilizó agua pura como vehículo.

Para la pesada de las sustancias se ha empleado la Balanza Sartorius VWR

Para la preparación de las formulaciones ha sido empleado un agitador de varilla IKA Eurostar power que alcanza las 3000 rpm necesaria para una correcta homogeneización de los ingredientes añadidos.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Determinación pH:

Se realizará la prueba con Utilización de equipo pH-metro Mettler Toledo y siempre se realizará la medida por triplicado. En primer lugar, se procederá a la calibración del equipo. Una vez que hemos realizado la calibración y hemos limpiado y secado el electrodo, procederemos a realizar la medición de la muestra.

4.2.2. Determinación de la Viscosidad

Para medir la viscosidad de las formulaciones utilizamos un viscosímetro rotacional (fungilab, modelo: Smart, #serie: smar200030) el cual opera por medio de la rotación de un disco llamado husillo que se sumerge en una muestra de la formulación. El husillo utilizado para medir la viscosidad fue el R7 y la velocidad empleada para la medición

fue 100 rpm. El dato de viscosidad se determina luego de que el husillo haya rotado en la muestra por 1 minuto. Se realizan 3 medidas de viscosidad para cada formulación y se calcula el promedio.

4.2.3. Determinación de la estabilidad mediante el empleo de centrifugación.

Para esta prueba se utilizó la centrifuga con rotor para placas y tubos con capacidad refrigeradora (Hermle, modelo: Z36HK, #serie: 58120057).

4.2.4. Prueba de Extensibilidad

Para determinar la extensibilidad se utilizó un extensómetro con un vidrio graduado y un conjunto de pesas (Figura 14).



Figura 14. Extensómetro, vidrios graduados y pesas.

Con este método se puede determinar la mayor o menor fluidez de la muestra, de acuerdo con los resultados obtenidos. En todos los casos son media de tres determinaciones.

4.2.5. Estudio de liberación/permeación con Células de Franz

En las formulaciones tópicas, la evaluación de la permeación es fundamental para establecer la biodisponibilidad y, por lo tanto, hacer una aproximación de la efectividad. Además, para las formas de dosificación semisólidas, las metodologías para probar y verificar el rendimiento en las etapas de pre-formulación del producto son esenciales para evitar pruebas de rendimiento adicionales una vez que el producto esté listo para el mercado.

Las células de Franz son una metodología ampliamente utilizada para evaluar la liberación y permeación in vitro del principio activo, que tiene ventajas, como (i) poca manipulación de los tejidos, (ii) no se toma una muestra continua y (iii) se requiere una cantidad baja de principio activo para el análisis.

En este trabajo, se utilizan células de Franz (FDC-400) de 1 cm de diámetro, suministradas por la firma Vidra-Fox (Barcelona, España) (Figura 15). Estas células de difusión de Franz son un sistema compuesto por dos cámaras, una donante y otra receptora, separadas por una membrana de origen animal, humana o sintética que permite evaluar la difusión de moléculas biológicamente activas de una cámara a otra.



Figura 15. Sistema células de Franz

Para estudiar la liberación, se trabaja con un tipo de membrana que minimice al máximo la resistencia al paso de la formulación y así poder determinar con fiabilidad la influencia del vehículo en la cesión del mismo. En el compartimento dador, se coloca una muestra representativa de la formulación en estudio y en el receptor una solución que permita solubilizar la sustancia que difunde. En este caso para el estudio del factor de crecimiento epidérmico, se utiliza tampón fosfato pH 7.4 ya que es el pH al cual la proteína es estable.

Se toman alícuotas de 600 μ l del compartimento receptor a diferentes tiempos durante un periodo establecido (30 minutos, 3 horas, 24 horas) y el volumen extraído se repone con solución receptora. A continuación se mide el principio activo liberado mediante el método analítico adecuado.

En el estudio de permeación de las formulaciones se utilizó piel de pollo desprovista de su contenido graso con la ayuda de un dermatomo (Dermatome 75mm, Nou Vag AG, Suiza), y se obtuvieron trozos de aproximadamente 9 cm² para obtener finas capas de piel (500 µm de espesor) y evitando la perforación de la piel durante el corte. Una vez cortada se coloca en papel aluminio y se mantiene congelada hasta el momento de su utilización.

Cuando se utiliza, hay que tener la precaución de colocar la parte dérmica en contacto con la solución receptora. Para ello utilizamos como soporte unos discos de acero inoxidable de 4 cm de diámetro y una abertura central de 2 cm, abertura que coincide con la superficie de difusión de las células utilizadas. Estos discos están constituidos por dos partes de modo que la piel queda perfectamente sujeta por dicho soporte para su correcta utilización en el ensayo propuesto (Figura 16) (93).



Figura 16. Discos de acero para células de Franz

4.2.6. Espectrofotometría UV-Visible

Para caracterizar el factor de crecimiento epidérmico, se utiliza como método analítico la espectrofotometría ultravioleta-visible, realizando las determinaciones con un espectrofotómetro Pelkin-Elmer UV/Vis Lambda 40 (Figura 17).



Figura 17. Espectrofotómetro utilizado en las medidas de absorbancia de los activos.

Este método utiliza la radiación del espectro electromagnético cuya longitud de onda está comprendida entre los 100 y los 800 nm y su efecto sobre la materia orgánica es producir transiciones electrónicas entre los orbitales atómicos y/o moleculares de la sustancia. En la espectrofotometría UV-Vis, la muestra absorbe UV-Vis y la energía adquirida por el sistema causa la transición de un electrón de un estado basal a uno excitado. Esta energía de transición está relacionada con la longitud de onda de la radiación (94).

4.2.7. Constantes microbiológicas relevantes

A las formulaciones estudiadas se le realizan los ensayos microbiológicos regulados según Reglamento (CE) nº 1223/2009.

Los análisis se realizaron siguiendo la directiva de Análisis microbiológico de cosméticos y productos sanitarios y siempre con campana de flujo laminar.

Cuando se va a realizar algún cultivo, ya sea en caldos o en superficie a partir de placas ya preparadas, se deben sacar de la nevera y ponerlas en la CFL unos 15-20 minutos antes del sembrado para evitar choques térmicos que enmascaren resultados, e intentando que no se produzcan contaminaciones en los medios.

– Preparación de la muestra

Antes de preparar las muestras, limpiarlas con gasas impregnadas en alcohol de 70°, haciendo especial hincapié en las zonas de rotura y de apertura y esperar hasta que se sequen por evaporación. A continuación, evitando que caigan cristales se realizará la apertura y mediante una jeringa estéril se recogerán las muestras en un vaso colector también estéril.

Se diluirá el producto directamente en una solución estéril de agua tamponada de peptona pH 7.0 o en una solución estéril de TSB según las pruebas para las que se vaya a utilizar la muestra y usando siempre tubos de ensayo o frascos con tapón de rosca o similares.

Mediante este proceso se realizarían diluciones madre 1:10. A partir de estas diluciones madre se realizarán las pruebas microbiológicas por triplicado. A continuación se resumen las diluciones madre que se preparan para hacer las pruebas microbiológicas.

Prueba	Agua de peptona tamponada a pH 7		Caldo Digerido de Caseína Soja (TSB)	
	M1	M2	M1	M2
TAMC	1 mL	1 mL	-	-
TYMC	1 mL	1 mL	-	-
<i>E. coli</i>	1 mL	1 mL	-	-
<i>S. aureus</i>			-	-
<i>P. aeruginosa</i>			-	-
<i>C. albicans</i>	1 mL	1 mL	-	-
Total tubos con dilución madre 1:10	12 mL muestra + 108 mL Agua de peptona tamp. (Total 120 mL de solución madre)		22 mL muestra + 218 mL de Caldo TSB (total 240 mL madre)	
Total muestra utilizada	34mL (7 viales 5 mL)			

Tabla 6. Diluciones madre a preparar para los ensayos microbiológicos. Recuento total de microorganismos aerobios (TAMC) y recuento total combinado de hongos filamentosos y levaduras (TYMC) mediante técnica de recuento en superficie

Especificaciones

- Mesófilos y aerobios viables totales: < 1000 UFC/mL
- Hongos y levaduras: <100 UFC/mL

Determinación de la ausencia/presencia de patógenos

Especificaciones

Detección de la presencia/ausencia de Candida albicans

Especificaciones

- *Candida albicans*: Ausencia/mL

Determinación de la presencia/ausencia de Pseudomonas aeruginosa

Especificaciones

- *Pseudomonas aeruginosa*: Ausencia/mL

Determinación de la presencia/ausencia de *Escherichia coli*

Especificaciones

- *Escherichia coli*: Ausencia/mL

4.2.8. Estabilidad de la formulación

▪ **La estabilidad** es la capacidad que tiene un producto de mantener sus especificaciones de calidad establecidas en el envase que lo contiene durante su período de validez, almacenado en las condiciones especificadas. Para el estudio de estabilidad, se realizan

- i. ensayos que permiten obtener información para establecer el periodo de validez de un producto en su envase original en las condiciones de almacenamiento especificadas. En primer lugar, se aconseja realizar unos estudios de estabilidad previa, para ello tras la finalización de cada formulación las pruebas que se realizan son:

Prueba de centrifuga: calentar a 50°C y centrifugar 30 minutos a 3000 r.p.m. En el caso de las emulsiones no deben presentar separación de fases. En el caso de productos compuestos por una única fase no deben presentar precipitado. La centrifugación produce estrés en la muestra simulando un aumento en la fuerza de gravedad, aumentando la movilidad de las partículas y anticipando posibles inestabilidades. Estas podrán ser observadas en forma de precipitación, separación de fases, formación de escamas (caking), coalescencia. En nuestro estudio las muestras se centrifugan según protocolo establecido, en el que cada muestra de formulación se calienta a baño maría aproximadamente a 50°C y se centrifuga a 3000 rpm durante 30 minutos. Se evalúa visualmente la muestra.

– *Prueba de microscopio:* solo aplicable a emulsiones, se toma una muestra y se observa al microscopio para ver homogeneidad del tamiz. Para considerar estable una emulsión al microscopio los glóbulos observados tienen que tener un aspecto homogéneo. Si se observan glóbulos irregulares significa que la emulsión es inestable.

– *Ciclos de frío / calor:* el producto debe pasar tres ciclos de temperatura de -20°C a 25°C. Poner el producto a -20°C durante 24 horas y a continuación poner a temperatura ambiente durante 24 horas. Esto completa un ciclo. El producto debe pasar tres ciclos sin que se produzca separación de fases. Se debe comprobar igualmente que no se produzca variación significativa en valores de viscosidad y pH.

Si los productos pasan el estudio de estabilidad previa, se realizará un estudio de estabilidad acelerada y un estudio de estabilidad a largo plazo que dure tanto como el periodo de validez que se quiera dar al producto. Los estudios de estabilidad acelerada se diseñan para lograr el incremento de la velocidad de degradación química o física de

un producto, mediante condiciones de almacenamiento extremas o exageradas en su envase original, con el propósito de estudiarlas reacciones de degradación y predecir el período de vida bajo condiciones normales de almacenamiento. En los estudios de estabilidad a largo plazo, se controlan las propiedades físicas, químicas y microbiológicas, bajo condiciones de almacenamiento controladas, durante el periodo de validez propuesto del producto, en el envase que se propone para su puesta en el mercado.

Es necesario conocer que:

- **Validez:** Período de tiempo durante el cual se espera que un producto, almacenado correctamente, satisfaga las especificaciones establecidas. Se emplea para determinar la fecha de caducidad del producto y se determina a través de estudios de estabilidad.
- **Periodo de validez provisional:** Es aquel que se aprueba de forma preliminar, a partir de los resultados obtenidos en los estudios acelerados y a tiempo real (máximo 2 años).
- **Periodo de validez definitivo:** Es aquel que se aprueba para confirmar o ampliar el período de validez provisional, a partir de los resultados obtenidos de estudios de estabilidad a largo plazo (máximo cinco años).

Mención aparte merece tener en consideración la realización de ensayos en condiciones extremas (*Stress Testing*) para evaluar mejor la estabilidad del producto. Las condiciones extremas que se podrían utilizar serían de:

Estudios de estabilidad acelerados (corto plazo): Estudios diseñados para lograr el incremento de la velocidad de degradación química o física de un producto, mediante condiciones de almacenamiento extremas o exageradas en su envase, con el propósito de monitorear las reacciones de degradación y predecir el período de vida bajo condiciones normales de almacenamiento. Se trata de evaluar las especificaciones del producto que entrará en el mercado, durante 3 y/o 6 meses.

Estudios de estabilidad a largo plazo: Son estudios diseñados de las características físicas, químicas y microbiológicas, bajo condiciones de almacenamiento controladas, durante el periodo de validez propuesto del producto.

TIPO DE ESTUDIO	TEMPERATURA	% HUMEDAD	TIEMPOS ANÁLISIS
Estabilidad acelerada	$40 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$	75% RH \pm 5%	3 ó 6 meses
Estabilidad a largo plazo	$25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$	60% RH \pm 5%	Mínimo 12 meses

Tabla 7. Condiciones de almacenamiento de las muestras en los dos tipos de estabilidad

Una vez realizadas nos darán idea de las distintas alteraciones que puede sufrir la formulación estudiada.

4.3. DESARROLLO GALENICO

DESCRIPCIÓN: Se pretende conseguir una formulación de alta viscosidad, mucoadhesiva, de sabor agradable y sin olor.

COMPOSICIÓN

- **Principios activos:**

ÁCIDO HIALURÓNICO (Sodium Hyaluronate):

Se emplea en este estudio la sal sódica del ácido hialurónico, -hialuronato de sodio- es un glucosaminoglicano lineal, la unidad repetitiva es un disacárido constituido por D-glucuronato sódico (48%) y N-acetil D-glucosamina (52%).

El hialuronato de sodio se obtiene por fermentación a partir de sustratos de origen vegetal. La biosíntesis la realizan microorganismos del género *Streptococcus*

El ácido hialurónico (HA) está presente de forma natural en todos los organismos vivos, y es un componente universal de los espacios existentes entre células de los tejidos (espacio extracelular), constituye una matriz extracelular que permite lubricar, absorber, transportar los nutrientes en las células y eliminar los residuos. El papel principal de HA es captar agua y permitir el transporte de metabolitos clave y por lo tanto mantener la estructura e integridad de estos tejidos (46). Representa una de las moléculas más higroscópicas conocidas en la naturaleza (95). Como material físico de fondo, funciona como relleno espacial y lubricante. Los estudios in vitro y en animales han demostrado que HA aumenta significativamente la resistencia a la tracción del tejido de granulación, estimula la formación de coágulos, induce la angiogénesis, aumenta la osteogénesis y no interfiere en los nódulos de calcificación durante la formación del hueso (96). Además, HA facilita la migración y diferenciación celular durante la formación de tejidos y la reparación de tejidos blandos y duros. Recientemente, se ha demostrado que mejora las células del ligamento viabilidad e incluso diferenciación osteogénica temprana in vitro. Todas estas propiedades mencionadas son esenciales para el tejido. regeneración y cicatrización de heridas (97).

El peso molecular y la concentración determinan el uso de HA. El HA de alto peso molecular funciona como un polímero de película que reduce la evaporación del agua, con una acción de tipo oclusivo. El peso molecular medio y el peso molecular bajo, hacen que el HA, tenga propiedades principalmente como humectante debido a su alta

higroscopicidad (98). HA se ha utilizado para aplicaciones farmacéuticas, médicas, alimentarias y cosméticas, debido a sus excelentes propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, no inmunogenicidad, mucoadhesividad, higroscopicidad, viscoelasticidad y lubricidad. Se ha comprobado también que tiene propiedades antiinflamatorias, e inmunosupresoras (54).

Es interesante en el caso que nos ocupa, el comprobar cómo también el HA estimula la cicatrización temprana de los huesos largos y la formación de dentina reparadora. Asimismo, el HA es un componente indispensable de la mucosa oral y tiene muchas propiedades que lo convierten en una molécula fundamental para ayudar a la cicatrización de las heridas. Durante la cicatrización, el HA actúa inhibiendo la inflamación y favoreciendo la renovación epitelial y la angiogénesis del tejido conjuntivo (99). Es así mismo un componente clave de las etapas asociadas con el proceso de cicatrización de los tejidos periodontales tanto mineralizados como no mineralizados (100).

En los tejidos periodontales mineralizados como el hueso alveolar, la fase de tejido de granulación es reemplazada gradualmente por un callo mineralizado provisional. Durante dichas etapas, el hialurónico contribuye a una variedad de funciones celulares, tales como la promoción de la migración de las células de la matriz extracelular en la matriz de la herida, la proliferación celular, y la organización del tejido de granulación. Estos eventos permiten la reinserción de la capa basal del epitelio gingival a la lámina basal y a la maduración completa de los tejidos mineralizados resultantes en la reforma de una unión en la interfase del diente (101).

Debido a todas estas propiedades, el HA se presenta como un componente fundamental del tratamiento de la retracción de las encías así como del tratamiento de las afecciones de la zona perilabial debidas al envejecimiento o a la pérdida de la estructura gingival. Por lo tanto, la administración de HA en los espacios periodontales podría lograr beneficios comparables en cicatrización periodontal, y de esta forma ayudar en el tratamiento de la periodontitis (102). El HA utilizado en este trabajo es en forma de hialuronato sódico, tiene un PM de 1 Millon de Dalton y ha sido suministrado por FAGRON IBERICA.

FACTORES DE CRECIMIENTO: Se incorporarán a las formulaciones factor de crecimiento, epidermal growth factor (EGF). Un polipéptido producido por las células de la piel. Se ha comprobado su eficacia en la formación de epitelios y mucosas, en la reparación del epitelio digestivo desde la mucosa bucal hasta la intestinal. A partir de la presencia del EGF en la saliva y de su conocido papel en la correcta homeostasis de la mucosa del sistema digestivo, es muy utilizado como coadyuvante para el tratamiento de lesiones orales como úlceras (103). En este trabajo de Tesis Doctoral, se ha utilizado el EGF suministrado por Cell Signaling y el EGF en solución oleosa, que es la presentación patentada por Inves Biofarm, donde el EGF permanece estable durante tres años lo cual garantiza su eficacia biológica (104).

- **EXCIPIENTES:**

-LIPOSYSTEM COMPLEX® es un complejo de ingredientes activos y fosfolípidos. Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas hechas de glicerol, unidas a dos cadenas de ácidos grasos, mientras que la parte restante consiste en un compuesto hidrofílico, generalmente colina, serina, etanolamina o inositol. La adición de agua al Liposystem Complex® provoca la formación natural de pequeños liposomas unilaminares, con el principio activo directamente unido a la capa de lípidos. La naturaleza anfipática de los fosfolípidos que constituyen la doble capa lipídica de la membrana liposomal, permite la creación preliminar de enlaces con moléculas hidrofílicas y lipofílicas y el principio activo se vincula a la parte hidrofílica o hidrofóbica correspondiente de la vesícula liposomal. Los liposomas complejados obtenidos ofrecen una mayor superficie de unión al principio activo, proporcionando así una propiedad de encapsulación muy alta de la molécula activa, cercana al 100%. La importancia de Liposystem Complex® en la formulación es considerable: actúa como un portador natural, aumenta la absorción del principio activo. El principio activo complejo está protegido de las agresiones químicas y enzimáticas y se libera casi por completo en su sitio de acción.

-EDTA: Agente quelante Sinergismo con antioxidantes. Disminuye la velocidad de las reacciones de oxidación, pues son catalizadas por metales. Soluble en agua, bastante soluble en alcohol. La concentración usual como agente quelante y sinérgico de antioxidantes en preparaciones farmacéuticas y cosméticas es: 0.005-0.1 % (p/v).

-SORBITOL: tiene propiedades humectantes y estabilizantes, usándose en varios productos farmacéuticos y cosméticos, incluyendo dentífricos. También permite la solubilidad de muchos principios activos y su posterior incorporación a las formas farmacéuticas tópicas. La solución al 70% puede reemplazar a la glicerina, ya que es menos higroscópica.

-GOMA XANTANA: coloide hidrófilo que se utiliza como agente espesante, suspensor y para emulsificar y estabilizar sistemas de base acuosa en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria.

-POVIDONA agente espesante de sistemas acuosos: a diferencia de las gomas naturales, es una sustancia menos susceptible a la contaminación microbiológica. Es un agente granulador. Prácticamente inodoro, aumenta la solubilidad en agua de principios activos y proporciona un sabor dulce a los preparados orales. De esta forma permite reducir e incluso evitar, el uso de azúcares, sales o alcohol en las formulaciones. Mejora el sabor de los preparados amargos.

-PROPANEDIOL: emoliente, humectante, solubilizante y viscosizante.

-XILITOL: Edulcorante, al disolverse por acción del calor produce una sensación de frescura en la boca, por eso es más utilizado en preparados para uso bucal respecto a otros endulzantes.

-GLICEROL: con propiedades humectantes y estabilizantes, usándose en varios productos farmacéuticos y cosméticos, Presenta numerosas aplicaciones, usándose como disolvente, edulcorante, conservante, plastificante en recubrimiento de comprimidos y como regulador de la tonicidad. A veces se incluye en fórmulas tópicas como lubricante y por sus propiedades humectantes, pudiendo su acción higroscópica potenciar la retención de humedad. Líquido viscoso, untuoso al tacto, incoloro, transparente, muy higroscópico.

-HIPROMELOSA: también conocida con su nombre INCI Hydroxypropyl Methylcellulose, La hipromelosa es un derivado semisintético de la celulosa. Es el éter metílico de hidroxipropilcelulosa. Se presenta en distintos grados que contienen del 16.5

al 30 % de grupos metoxi y del 4 al 32 % de grupos hidroxipropoxi. De este modo, posee distinta viscosidad y temperaturas de gelación. Se hincha en agua y produce una mezcla coloidal viscosa. Experimenta una transformación reversible de sólido a gel al calentar y enfriar, respectivamente. Insoluble en alcohol absoluto, éter y cloroformo. Higroscópico, se presenta como un polvo blanco o blanco-amarillento, fibroso o granular.

-TWEEN 80: también conocido como Polysorbate 80. Es un líquido oleoso, amarillo. Miscible en agua. Los polisorbatos son emulgentes no iónicos, con poder emulgente y suspensor más intenso y amplio, que facilitan la interposición de aceites en agua. Se ha descrito que los polisorbatos son estables con electrolitos y ácidos y bases débiles, aunque es posible que se produzca saponificación en presencia de ácidos y bases fuertes.

BENZOATO SÓDICO: Sodium benzoate. Polvo cristalino o granulado, blanco, ligeramente higroscópico. Fácilmente soluble en agua. Se emplea además, como conservante en lugar del ácido benzoico por su mayor solubilidad en agua.

-CARBOXIMETILCELULOSA: Carmelosa sódica. Polvo granuloso, blanco o casi blanco, higroscópico tras su desecación. Prácticamente insoluble en acetona, en etanol al 96%, y en tolueno. Se dispersa fácilmente en agua dando disoluciones coloidales. Es un coloide hidrófilo de acción y usos similares a la metilcelulosa. Da geles de buena consistencia pero sin una gran transparencia y de color pardo acaramelado. Tienen una gran adhesividad, lo que les hace muy útiles como excipientes semisólidos bucales. Los geles que forma con el agua son de carácter aniónico y estables a $\text{pH} = 4 - 10$. Conviene humectarla con glicerina previamente a su gelificación, a fin de evitar la desecación del gel. Es ampliamente utilizada también como emulsificante en emulsiones O/W (aunque es menos efectiva que la metilcelulosa). Se emplea también en la protección mecánica de lesiones orales y periorales formando parte de excipientes como el orabase, y como sustituto de la saliva fisiológica en xerostomía.

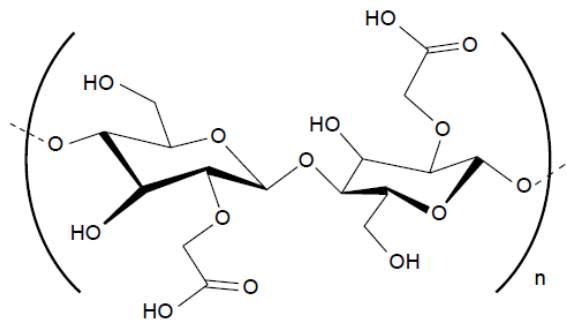


Figura 18. Estructura de la Carboximetilcelulosa. Imagen modificada de (105)

-CARBOPOL: Las resinas de Carbopol son polímeros de ácido acrílico reticulados, que se hinchan en agua dando lugar a un espesado extremadamente eficiente con un amplio rango de características reológicas, y actuando como estabilizador de emulsiones.

El alto porcentaje de grupos de ácido carboxílico son los que permiten el hinchamiento de las resinas con el agua. Dispersadas en agua, las moléculas de carbómero se hinchan parcialmente y desarrollan algo de viscosidad. Cuando se neutralizan con una base soluble en agua, las moléculas de resina se hinchan completamente y la viscosidad se incrementa. Las distintas resinas se diferencian según su peso molecular, el grado de reticulado y la estructura molecular. De estas diferencias dependen las características específicas reológicas y el espesado eficiente de cada resina. Se emplea como agente emulsificante, viscosizante, suspensor y gelificante, en fórmulas como soluciones, suspensiones, cremas, geles, y pomadas. Como gelificante, los carbómeros forman geles neutros transparentes (para formar el gel es necesario neutralizar el Carbopol con una base del tipo trietanolamina o una solución de hidróxido sódico al 10%). El gel de Carbopol es una base extensible no grasa, que aumenta la absorción de los principios activos incorporados. En este trabajo hemos utilizado el Carbopol 940.

-ÁCIDO CÍTRICO: Polvo blanco cristalino, cristales incoloros o gránulos. Se utiliza como regulador del pH. La forma monohidrato potencia esta acción acidificante. También como sinérgico para aumentar la efectividad de los antioxidantes. Su mecanismo de acción se basa en formar complejos con los metales que catalizan las reacciones de oxidación.

-CITRATO SÓDICO: se utiliza principalmente como acidulante, aromatizante y conservante en alimentos y bebidas también se utiliza como antioxidante. El citrato monosódico se emplea en ungüentos y colirios, el disódico se usa como antioxidante

para conservar los alimentos así como para mejorar el efecto de otros antioxidantes. También se emplea como regulador de acidez presente en gelatinas, jamones, helados, bebidas gaseosas, vinos, quesos procesados, entre otros productos.

4.3.1. Preparación de las formulaciones

Tras una serie de ensayos previos con distintas formulaciones, se han seleccionado las que hemos considerado serían más interesantes en nuestro trabajo, son las que se recogen en la (Tabla 8. **Composición de las formulaciones** en la que se muestra los componentes y cantidades utilizados. A continuación se explican los procesos para el desarrollo de las diferentes formulaciones:

Tabla 8. Composición de las formulaciones					
Emulsión		Hidrogel		Emulsión Liposomada	
<u>Ingredientes</u>	<u>(%)</u>	<u>Ingredientes</u>	<u>(%)</u>	<u>Ingredientes</u>	<u>(%)</u>
Hialuronato Sódico	1	Hialuronato Sódico	1	Hialuronato Sódico	1
EGF Patentado	1	EGF en PBS	1	EGF Patentado	1
Carbopol 940	1	Sorbitol 70%	50	Glicerol	20
CMC-Na	1	Povidona	1	CMC-Na	1
-----		-----		Goma Xantana	0.5
Glicerina	20	Propanediol	5	Carbopol 940	0.5
Hipromelosa	1	Goma Xantana	1	Hipromelosa	1
Ácido Cítrico	0.125	EDTA	0.05	Ácido Cítrico	0.125
Citrato Sódico	0.29	Ácido Cítrico	0.125	Citrato Sódico	0.29
Tween 80	2	Citrato Sódico	0.29	Liposistem Complex	2.0
Benzoato sódico	0.25	Benzoato sódico	0.25	Benzoato sódico	0.25
Agua	csp 100	Agua	sp 100	Agua	csp100

En este estudio se diseñaron varias formulaciones de uso bucal con excipientes idóneos para ese tipo de aplicación entre los que se encuentran xilitol, mentol además de gelificantes. De las fórmulas diseñadas inicialmente se descartaron aquellas que llevaban excipientes que pudieran alterar el sabor, olor del preparado. Seguidamente se diseñaron y desarrollaron tres tipos de presentaciones con características diferentes, tanto desde el punto de vista de su composición como desde un punto de vista tecnológico, se preparó, un hidrogel, una emulsión y una emulsión liposomada (utilizando un complejo con liposomas llamado Lyposystem Complex®). Para cada presentación se desarrollaron inicialmente tres formulaciones en donde se variaba la composición y concentración de los excipientes según las características que iban presentando. Para el diseño de las formulaciones se tuvieron en cuenta diferentes variables como la apariencia visual, el color, el olor, la viscosidad, el pH, la textura, la sensación al aplicarlo y la capacidad de extenderse. En el desarrollo de estas formulaciones los cambios que se hicieron fueron con los polímeros, los demás excipientes se cambiaban en función de éstos. Para determinar qué polímero y en qué cantidades debía utilizarse, nos basamos en la información de la ficha técnica de cada uno, así como en estudios previos realizados por otros autores. Tras el desarrollo de las diferentes formulaciones, se seleccionó la formulación que, además de tener las propiedades organolépticas y fisicoquímicas deseadas, pudiera vehicular el factor de crecimiento epidérmico al aplicarlo por vía tópica para garantizar su retención y penetración y lograr el posible efecto de regeneración del tejido gingival buscado, objetivo de esta tesis.

Para todas las formulaciones se seleccionó el agua como vehículo considerando su compatibilidad con la encía y su amplia capacidad disolvente debido al pequeño tamaño de su molécula, polaridad, alta constante dieléctrica y su facilidad para formar puentes de hidrógeno. Los principios activos de las formulaciones fueron el ácido hialurónico y el factor de crecimiento epidérmico ya que se consideró que juntos podrían actuar logrando un efecto regenerador de alto impacto debido a sus propiedades humectantes y regeneradoras de tejido respectivamente. Se tuvo en cuenta que fuera un producto fácil de extender para facilitar la aplicación de parte del profesional pero que no fuera muy fluido para que se pudiera quedar durante un tiempo adecuado en la zona de aplicación y así permitir la acción de la proteína.

Durante el diseño y el desarrollo de formulaciones que incluyen el factor de crecimiento epidérmico se tuvo en cuenta que, tratándose de una proteína globular, puede sufrir desnaturalización cuando se expone a condiciones extremas de temperatura o de pH y por lo tanto se deben tomar las medidas necesarias para evitar la pérdida de actividad por estas causas. Por ejemplo, cuando la proteína se calienta en medio ácido su estructura primaria se destruye por hidrólisis; además si la proteína llega a sufrir cambios importantes de pH, puede desnaturalizarse ya que los iones hidrógeno o hidroxilo del medio pueden reaccionar con los hidroxilos o hidrógenos de la proteína que están formando su estructura secundaria o terciaria por medio de puentes de hidrógeno. Por otro lado, el factor de crecimiento epidérmico tiene tres uniones o puentes disulfuros formados a partir de las cisteínas de la secuencia de aminoácidos. Estos son más estables que los enlaces de hidrógeno, pero pueden romperse en presencia de sistemas reductores alterándose su estructura terciaria (106).

Para proteger a la proteína de la desnaturalización, ésta se ha vehiculizado en dos medios: aceite patentado y tampón fosfato pH 7.4. Actualmente Inves Biofarm tiene registros de la estabilidad de la proteína en el aceite. Respecto a la proteína vehiculizada en el tampón fosfato, se han llevado a cabo estudios y se ha demostrado una cierta estabilidad en este tampón (107).

Sabiendo la estabilidad de la proteína en el medio acuoso (tampón fosfato 7.4) y en el medio oleoso, se quiso determinar si las formulaciones tópicas, además de mantener la proteína estable, podrían aplicarse logrando el contacto y penetración de la proteína para poder ejercer su acción de regeneración de tejido. De varias formulaciones desarrolladas, se seleccionó una para cada presentación. Estas formulaciones seleccionadas se compararon organoléptica y fisicoquímicamente para finalmente quedarnos con la formulación final que vehicularía la proteína.

Seguidamente se describen los detalles de elaboración de cada una de las formulaciones seleccionadas.

4.3.1.1. Emulsión

COMPOSICIÓN	%
HIALURONATO SÓDICO	1.0
EGF Patentado	1.0
CARBOXIMETILCELULOSA	1.0
GLICERINA	20
CARBOPOL 940	1.0
HIPROMELOSA	1.0
ÁCIDO CITRICO	0.125
CITRATO SÓDICO	0.29
TWEEN 80	2.0
BENZOATO SODICO	0.25
AGUA	csp 100

Tabla 9. Formulación para Emulsión

En la fase acuosa, se adicionan poco a poco y en continua agitación a unas 500 rpm, el ácido cítrico, el citrato sódico y benzoato sódico. Se continua la agitación durante 5 minutos y se adiciona el glicerol y el tween 80 manteniendo la agitación durante otros 5 minutos, para asegurar total solubilización. A continuación se incorpora la hipromelosa, que al ser un componente muy higroscópico necesita agitación lenta y gradual durante un tiempo entre 20-30 minutos para disolverse completamente. Se adicionó muy lentamente y en continua agitación para evitar la formación de grumos, la carboximetilcelulosa sódica y se dejó agitando hasta completa homogenización a una velocidad de 1000 rpm durante 10 minutos. La mezcla se dejó en reposo durante unos 5 minutos, hasta asegurarnos su perfecta homogeneización y estabilidad, en estas condiciones es cuando se procede a adicionar muy lentamente y en continua agitación para evitar la formación de grumos, el hialuronato de sodio. La velocidad se fue aumentando poco a poco conforme se adicionaba el hialuronato de sodio hasta llegar a 2000 rpm. Se mantuvo esta agitación durante unos 30 minutos, y finalmente se adicionó aceite con el factor de crecimiento epidérmico (EGF patentado). La emulsión se dejó agitando otros 20 minutos. Una vez preparada y totalmente homogénea se tomaron

muestras para centrifugar, para medir pH y viscosidad y para determinar su extensibilidad.

4.3.1.2. Emulsión Liposomada

COMPOSICIÓN	%
HIALURONATO SÓDICO	1.0
EGF Patentado	1.0
CARBOXIMETILCELULOSA	1.0
CARBOPOL 940	0.5
GOMA XANTAN	0.5
GLICEROL	20
HIPROMELOSA	1
ÁCIDO CITRICO	0.125
CITRATO SÓDICO	0.29
LIPOSYSTEM COMPLEX	2.0
BENZOATO SÓDICO	0.25
AGUA	csp 100

Tabla 10. Formulación para Emulsión Liposomada con EGF en las dos formas de presentación

En el agua de la formulación, se adicionaron, uno a uno en continua agitación a 500 rpm los siguientes componentes: ácido cítrico, citrato sódico y benzoato sódico. Aparte se procede a la humectación de la goma xantana con glicerol, una vez realizada esta humectación se incorpora a la disolución anterior incrementando la agitación hasta unas 1000 rpm, hasta completa homogeneización. Posteriormente se incorporaron la hipromelosa y la carboximetilcelulosa sódica, incrementando el proceso de agitación a unas 1500 rpm. Se obtiene una preparación viscosa, a la que se incorpora el carbopol, todo el proceso en continua agitación hasta la desaparición total de grumos y obtener un preparado completamente homogéneo, al que se adiciona el hialuronato de sodio y a continuación el aceite patentado con el factor de crecimiento epidérmico. Se obtuvo una emulsión, que se dejó en agitación otros 15 minutos, hasta una completa

homogenización. El último paso fue la incorporación del lyposystem complex, que debe hacerse a una temperatura de 40°C. Como en el caso anterior a la formulación estable y completamente homogénea es a la que se le realizaron los ensayos correspondientes.

4.3.1.3. Hidrogel

En este caso se prepara una formulación algo diferente, es un hidrogel, por lo que la proteína utilizada en este caso es la solución tamponada de la misma.

COMPOSICIÓN	%
HIALURONTO SÓDICO	1.0
TAMPÓN FOSFATO CON EGF	1.0
SORBITOL 70%	50
POVIDONA	1.0
PROPANEDIOL	5.0
GOMA XANTAN	1.0
EDTA	0.05
ÁCIDO CITRICO	0.125
CITRATO SÓDICO	0.29
BENZOATO SÓDICO	0.25
AGUA DESTILADA	csp100

Tabla 11. Formulación para Hidrogel

Al agua de la fórmula se adicionan en continua agitación a 500 rpm los siguientes componentes: EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), ácido cítrico, citrato sódico y benzoato sódico y sorbitol. Se añade el tampón fosfato con EGF a la preparación y se deja en agitación. Aparte se ha humectado povidona con propanediol y la goma xantana, incorporando esta mezcla a la solución acuosa anterior, e incrementando la velocidad de agitación hasta unas 1000 rpm. Cuando la preparación está homogénea se adiciona el hialuronato de sodio. El hidrogel obtenido, se dejó agitando hasta completa homogenización a una velocidad de 2000 rpm durante una hora. Transcurrida ese tiempo se dejó en reposo. Cuando se observó un hidrogel estable, homogéneo y libre de burbujas de aire, se tomaron muestras para determinar su estabilidad, de forma semejante a los casos anteriores.

4.3.2. Ensayo de la actividad "in vitro"

La efectividad biológica del EGF se estudiará mediante cultivo in vitro empleando las líneas celulares, suministradas por el banco de células del CIC de la Universidad de Granada, mostradas en la Figura 19 y que corresponden a fibroblastos normales obtenidos a partir de piel humana y la línea celular CCD-18co de fibroblastos procedentes de colon humano normal (ATCC).

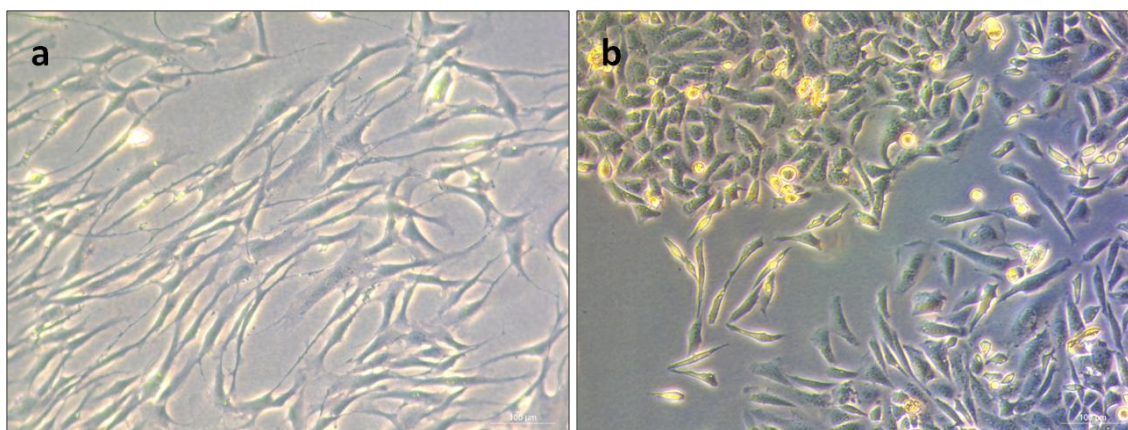


Figura 19. Líneas celulares a emplear en el estudio de actividad biológica del EGF: fibroblastos de piel (a) y fibroblastos de colon humano CCD-18co.

Como medio de crecimiento para ambos tipos celulares se usa Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma-Aldrich) rico en glucosa y suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS; Lonza), 1% (v/v) de penicilina-estreptomina (P/S; Sigma-Aldrich) y 1% (v/v) de ciprofloxacina (Sigma-Aldrich) y los cultivos se mantienen incubados a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa. 48 horas después del tratamiento se realizó el ensayo de viabilidad MTT (108). Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, MTT (Sigma-Aldrich), realizada por el enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, dando lugar a un compuesto coloreado en azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. La medición se realizó por espectrometría a 570 nm en un lector de placas multipocillo Victor2™ (Perkin Elmer), en función de los datos de absorbancia se determina la viabilidad celular. El sistema utilizado para la medida fue Infinitemanoqua®.

4.4. ESTUDIO CLÍNICO PILOTO

4.4.1. METODOLOGÍA

4.4.1.1. Diseño del estudio

Para el diseño del estudio se plantea un estudio piloto, en el que se pretende comprobar la eficacia de un producto, basado en el desarrollo de una emulsión de ácido hialurónico unido a la Proteína EGF, comparándolo con una emulsión control, que lleva HA, todos los componentes de la emulsión test a excepción del EGF.

La intervención realizada en los pacientes consiste en la aplicación por electroporación de una emulsión de con y sin coadyuvantes para la mejora de los agujeros negros, promover el crecimiento gingival y disminuir el tamaño del “black hole”.

-Unidad de análisis en el estudio:

Triángulos negros. Se mide el tamaño del mismo calibrando la distancia entre el punto de contacto interdentario y la papila con una sonda milimétrica.

Se tomaron fotos que han sido procesadas por un programa de análisis de imágenes (GIMP) evidenciando en negro la zona del triángulo y dejando la foto en blanco creando un contraste. El programa calculó los píxeles que corresponden solo a las zonas negras. Para medir las eventuales diferencias se convirtieron los píxeles en un tamaño físico (37).

4.4.1.2. Duración del estudio

La duración del estudio ha sido de 1 año. Siendo el periodo de reclutamiento de pacientes de 6 meses, el tiempo de seguimiento se ha hecho durante 6 meses del inicio en cada paciente.

4.4.1.3. Población de Referencia y Población de Estudio

La población de estudio han sido todos aquellos pacientes que han presentando agujeros negros o "*black holes*" interdentarios, en los que se indique la aplicación del tratamiento con ácido hialurónico y/o factor de crecimiento, para el cubrimiento del mismo dentro del centro odontológico incluido en el estudio, y que cumplan con los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

4.4.1.4. Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de Inclusión:

- Pacientes atendidos en la clínica de Odontología participante en el estudio.
- Que acepten formar parte del estudio mediante la firma del consentimiento informado.
- Pacientes con la información suficiente para la realización del estudio.
- Pacientes con boca sana, con encía acondicionada para que esté libre de sarro.
- Pacientes que tengan agujeros negros en sector anterior, comprendido entre caninos de ambas arcadas dentarias
- Pacientes que no hayan tenido tratamiento antibiótico en los últimos 6 meses.
- Pacientes con enfermedad periodontal estabilizada.
- Pacientes con edad comprendida entre 18 y 60 años.

Criterios de Exclusión:

- Alergia o intolerancia a la formulación objeto de estudio.
- Pacientes en tratamiento con cualquier medicamento que pueda generar hiperplasia gingival.
- Pacientes embarazadas o en periodo de lactancia
- Pacientes con enfermedades crónicas infecciosas como VIH o Hepatitis C.

4.4.1.5. Tamaño Muestral

Aunque se trata de una alteración gingival con una alta prevalencia, y dado que se ha realizado un estudio preliminar para determinar cuál es el tratamiento óptimo en este tipo de defecto en las encías, el número total de individuos a incluir ha sido de 23 pacientes, a los que se les pueda tratar entre 1 a 10 agujeros negros.

Para la elección de este número de pacientes, nos basamos en estudios similares (37).

4.4.1.6. Variables

El conjunto de variables recogidas de los pacientes a tratar son las siguientes:

Variables Independientes: registradas en la primera cita.

- Sexo; variable cualitativa: Varón, Mujer.
- Edad del paciente, variable cuantitativa, medida en años.
- Uso de otros tratamientos por el paciente.

- Consumo tabaco: nº de cigarrillos/día
- Consumo de alcohol (gramos/día):

Para calcular el contenido en gramos de una bebida alcohólica basta con multiplicar los grados de la misma por la densidad del alcohol (0,8):

$$\text{La fórmula sería: gramos de alcohol} = \frac{\text{volumen (en cc)} \times \text{graduación} \times 0,8}{100}$$

En España una «**Unidad de Bebida Estandar (UBE)**» es igual a **10 gramos de etanol puro** (109) y en Gran Bretaña equivale a 8 gramos

Establecemos que más de 3 vasos al día, por término medio, podría suponer más de 10 gramos de alcohol, superando la UBE.

- Higiene bucal: frecuencia de cepillado, uso de colutorios y seda dental.
- Bruxismo (rechinamiento de dientes)
- Apretador de arcadas
- Enfermedades sistémicas, como diabetes, hipertensión u osteoporosis.

Variables Dependientes:

- Altura del agujero negro, objeto de estudio, midiendo con sonda milimétrica la distancia entre el punto de contacto interdentario y el borde de la papila.
- Nivel de cresta ósea alveolar, distancia entre el cuello dentario o terminación de la corona hasta el hueso crestal, medido radiográficamente (Programa de análisis de imágenes Dent-A-View).
- Profundidad de sondaje y sangrado periodontal
- Área del espacio negro en mm², medidas en las fotografías mediante un programa de análisis de imagen.

Estas variables serán cuantificadas al inicio, a los 3 meses y a los 6 meses. Excepto la primera y la última, altura y área del agujero negro, que se hará una medición intermedia a los 3 meses.

4.4.1.7. Definición del procedimiento

Para la inclusión de los pacientes en el estudio, será necesario que se lea detalladamente la hoja de información al paciente, se firme el consentimiento informado y que se cumplan los criterios fijados para la inserción del paciente en el estudio. Firmado el consentimiento informado se procederá a tomar una fotografía perpendicular a los dientes de interés. Las fotos posteriores se tomarán en las mismas condiciones de posición y distancia para así poder hacer una comparativa.

Con el objeto de evitar el posible sesgo en la selección y asignación de los participantes a cada grupo, los pacientes incluidos en el estudio, tras el proceso de aleatorización consistente en sacar una bola de una bolsa que contiene la misma cantidad de elementos de dos colores diferentes (azul o rojo), serán tratados con el producto consistente en ácido hialurónico (AH) (grupo Control) o en ácido hialurónico más factor de crecimiento epidérmico (AH+EGF) (grupo Test).

La asignación del grupo (Control o Test) a cada color del paciente (Azul o Rojo) la hará el laboratorio InvesBiofarm, para asegurar el doble ciego, por parte del paciente y del operador clínico (G.G.P.) que interviene en la toma de registros clínicos, radiográficos y fotográficos, así como en la aplicación del producto en el tejido diana.

4.4.1.8. Plan de trabajo

El estudio clínico piloto aleatorizado fue realizado por la Universidad de Granada en cumplimiento de la Clínica Dental e Inves Biofarm. Fue un estudio controlado doble ciego que inscribió a 23 participantes. Durante la evaluación de la información del paciente sobre el sexo del sujeto, el alcohol, el tabaco y los hábitos de higiene bucal, frecuencia de cepillado, uso de enjuague bucal, uso de hilo dental, bruxismo, diabetes, hipertensión, osteoporosis, otras enfermedades sistémicas y número de agujeros negros. Reclutamiento de pacientes se llevó a cabo durante los primeros seis meses del estudio. El tratamiento se aplicó durante los siguientes cinco meses. Los pacientes asistieron a la Clínica Dental 1 mes después de la última sesión de tratamiento para evaluar los efectos del tratamiento.

El resultado principal del estudio fue evaluar los parámetros de periodontitis.

Se midieron tres variables clínicas de periodontitis: profundidad de sondaje (PD), pérdida ósea y pérdida de inserción clínica (CAL). La profundidad de sondaje se determinó mediante la línea de sondaje PCP-UN-C15. CAL se midió con imágenes de

periodoncio del paciente analizadas por el Programa de manipulación de imágenes GIMP. GIMP calculó el píxel negro (corresponde a defectos periodontales o agujeros negros) y los convierte a medida física. La pérdida ósea se determinó con la longitud de la cresta alveolar (ACL) medida con radiografías del periodonto del paciente y calculadas por el software Dent-A-View ©. Los datos de PD y CAL se recopilaron al principio, a los tres meses y al final. Los datos de pérdida ósea solo se recopilaron al principio y al final.

4.4.1.9. Ética

Este ensayo clínico fue aprobado por los comités de ética en investigación de la Universidad de Granada y llevado a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki. El estudio fue registrado clínicamente con el número 6 / CEIH / 2015

Todos los pacientes recibieron la información sobre el estudio y el consentimiento Informado para autorizar el tratamiento y garantizar el anonimato de los pacientes. Todos los voluntarios fueron reclutados en la Clínica Dental (Doctor E.S.F.) y aceptaron participar en el estudio. En primer lugar, se informó a cada participante con una hoja de información sobre el estudio y se firmó un consentimiento informado. La información de los pacientes y el resultado del estudio se guardaron en una base de datos informática anónima. El estudio incluyó a 23 pacientes adultos con defectos periodontales: 19 mujeres y 4 hombres de 18 a 60 años. 11 pacientes fueron asignados aleatoriamente al grupo 1 y los pacientes restantes (12) fueron asignados aleatoriamente al grupo 0.

Antes del tratamiento se realizara una limpieza o profilaxis dentaria y a continuación se realizará un sondaje periodontal mediante sonda periodontal PCPUNC15 (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) para determinar la profundidad de sondaje (PD) y la pérdida de inserción epitelial o grado de recesión (GR). Se tomará una radiografía intraoral digital para determinar el nivel de la cresta ósea, y se medirá, mediante un software de análisis digital de imagen (Dent-A-View©), la distancia entre la cresta ósea alveolar y el límite amelocementario de los dientes implicados en el proceso por mesial y distal.

Se medirá la distancia entre el punto de contacto interdentario y la papila (DPC-P). También se tomarán fotografías de las zonas a tratar, a una distancia determinada y con el mismo zoom en todas las sesiones y en todos los casos.

Estas dos determinaciones se realizaron en cada paciente al inicio, a los 3 meses, a los 6 meses.

Se aplicará el producto mediante máquina de electroporación con el terminal específicamente diseñado para la aplicación de principios activos en la mucosa oral, ya que debido a la forma puntiaguda de su boquilla se puede aplicar directamente en la encía de la papila interdientaria.

4.4.1.10. Aplicación del producto mediante electroporación

Utilizando la máquina de electroporación ITD System® (TDES) de Biotronic Advance Develops, en los dos grupos se aplicó la cantidad de producto, en forma de emulsión, que sea la más adecuada dependiendo del número y tamaño de triángulos negros presentes.



Figura 20. Máquina de electroporación ITD System (Biotronic Advance Develops)



Figura 21. Aplicador especialmente diseñado para la aplicación en encía

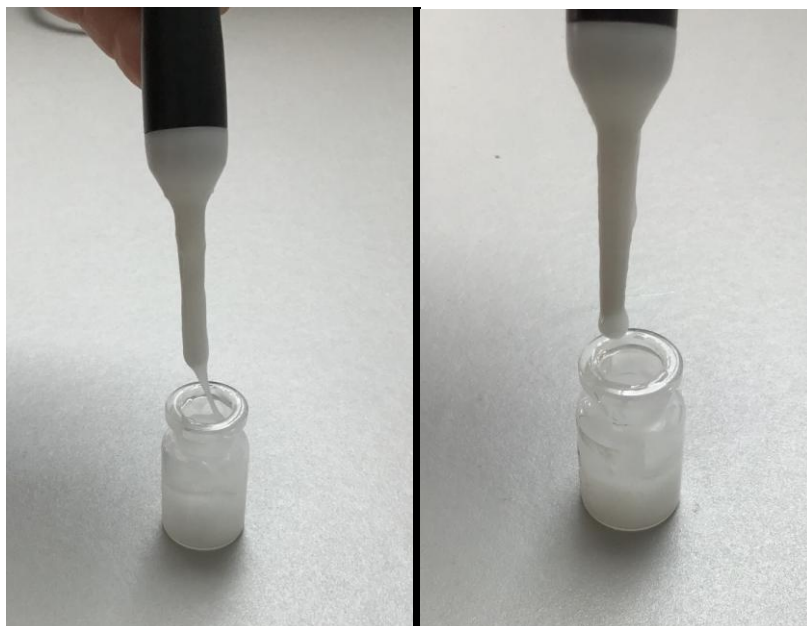


Figura 22. Aspecto de la emulsión junto con el cabezal aplicador

En la Figura 22. Aspecto de la emulsión junto con el cabezal aplicador se puede observar el aspecto de la emulsión seleccionada una vez que se predispone a su aplicación con el aplicador.

Se ha de introducir el producto con el NIVEL "sequence" de la máquina, para poder proceder con las fases 1 y 2 del programa:

- FASE 1: De 7 minutos de duración. Durante esta fase el aplicador impregnado con la formulación que contiene los principios activos, se coloca sobre la zona papilar en movimiento continuo. Trascurridos estos minutos se pasa a la fase 2.
- FASE 2: de 3 minutos de duración. Igualmente, el aplicador ha de moverse de forma continua, siguiendo movimientos circulares.

El tiempo de aplicación del producto se ha estimado siguiendo las instrucciones del laboratorio, en cuanto a la máxima absorción y penetración de los principios activos.

La aplicación de la emulsión se hará cada semana durante 4 semanas (4 sesiones). Después se repetirá cada 15 días durante 2 meses (4 sesiones). A continuación 1 vez al mes durante 2 meses (2 sesiones). Control a los 6 del inicio para comprobar la estabilidad de los beneficios conseguidos con el tratamiento.

Durante el tratamiento el paciente debe evitar el contacto directo con:

- el operador del equipo o con cualquier otra persona

- elementos de otros equipos conectados a la red eléctrica, dispositivos que puedan generar interferencias radioeléctricas (móviles, mp3, camillas eléctricas, etc.).

- el sujeto deberá despojarse de todos los objetos metálicos (reloj, collares, pulseras, monedas, llaves, etc.) durante la sesión.

Tras el estudio y toma de datos, se procederá al análisis estadístico de los resultados obtenidos.

4.4.1.11. Análisis de datos

Los datos recogidos sobre las variables dependientes e independientes serán procesadas mediante el programa estadístico SPSS v22.

En primer lugar se realiza un análisis estadístico descriptivo de cada una de las variables de la base de datos, para ello en el caso de las variables cualitativas (Sexo, Patología,...) se presenta una tabla de frecuencias (número de casos y porcentaje) y como representación gráfica el grafico de sectores. Para el caso de las variables cuantitativas se presentará para cada una de ellas: media, mediana, desviación típica.

Las variables descriptivas a analizar son sexo, edad, uso de otro producto o medicamento, consumo de tabaco y alcohol, higiene bucal, bruxismo, tensor. Las variables de resultado son PD, ACL y CAL.

Las variables se analizarán analizadas por el software SPSS v22. Se realiza análisis estadísticos descriptivos de cada variable experimental. La media, la desviación estándar y la mediana se calcularán para todas las variables clínicas. Este estudio se analizará sin prueba paramétrica (prueba de Wilcoxon y prueba de Mann-Witney) debido a que no hay datos normales y el tamaño de la población. La prueba de Wilconxon se utiliza para comparar la significancia entre las diferencias de medias. La prueba de Mann-Witney (prueba U) se utiliza para analizar la importancia entre el grupo 0 y el grupo 1.

Para todos los análisis se considerará significativo un valor $\alpha=0.05$.

4.4.1.12. Dificultades y Limitaciones del estudio

Se trata de un ensayo clínico en el que aplicamos un nuevo protocolo en cuanto a pauta de aplicación y forma de aplicación de la formulación estudiada ya que desconocemos el tiempo de reabsorción del producto

4.4.1.13. Seguridad

No se esperan reacciones adversas por la aplicación del producto desarrollado con hialurónico, ni con la- aplicación del producto de hialurónico más EGF.

4.4.1.14. Plan de difusión

En el presente proyecto se pretende indagar en la implicación que tiene el ácido hialurónico y la utilización de hialuronato sódico con proteína en la mejora y/o eliminación de los agujeros negros que se presentan en las arcadas dentarias a nivel de los espacios interdentarios

La difusión de los resultados seguirá el siguiente proceso: Publicación en revistas científicas de alto impacto científico; y Presentación en congresos y reuniones científicas nacionales e internacionales.

4.4.1.15. Utilidad y aplicabilidad

Con este estudio se pretende demostrar antes de proceder a un ensayo clínico más amplio y complejo, que el producto desarrollado sea seguro y que pueda dar mejores resultados con respecto a la disminución de los agujeros negros.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Propiedades Organolépticas de las formulaciones

Las propiedades organolépticas, la estabilidad previa y la extensibilidad se midieron para las tres formulaciones previamente preparadas.

Según la composición de las formulaciones, sus características organolépticas variaron bastante. Dependiendo del tipo y cantidad de polímero, las formulaciones se volvían más o menos untuosas y/o viscosas. No hubo adición de fragancia ya que este tipo de excipientes suelen ser alergénicos y al pretender un uso tópico, se evita cualquier reacción alérgica que éste pueda desencadenar. En la figura 19 se pueden observar las tres formulaciones obtenidas.

- **1ª formulación: Emulsión:** Se presenta como un producto blanco, viscoso, algo pegajoso y muy suave. Al aplicarla deja sensación de hidratación y de suavidad. No tiene olor y presenta un aspecto uniforme. La sensación pegajosa es debida a los polímeros como la carboximetilcelulosa ya que esta presenta una gran adhesividad. Su aspecto era mejor que el que tenían las otras formulaciones.
- **2ª formulación: Emulsión Liposomada:** Se presenta como un producto amarillo debido al complejo utilizado para la formación de liposomas. Se aprecia un preparado viscoso aunque es suave al aplicarla, fácilmente extensible. No es muy pegajosa. Deja un aspecto graso al aplicarla, y presenta un olor característico. Presentó grumos y partículas extrañas después de su agitación y separación de fases.
- **3ª formulación: Hidrogel:** Se presenta en este caso como un producto translucido, transparente y viscoso. Al no contener aceite, no deja sensación oclusiva en su aplicación. Es muy suave, refrescante, lo que puede ser debido a las propiedades aportadas por la goma xantana. La viscosidad del hidrogel fue la más baja de las tres formulaciones, debido fundamentalmente a su alto contenido en disolventes puesto que además del agua destilada, contiene un 50% de solución sorbitol al 70%; además el hidrogel no lleva ni carboximetilcelulosa ni carbopol los cuales aumentan considerablemente la viscosidad de las formulaciones.



Figura 23. Aspecto de las formulaciones

5.2. Prueba de Centrifugación

Las 3 formulaciones fueron sometidas a estabilidad acelerada para observar si había o no separación de fases o alguna otra alteración cuando las muestras se estresaban al simular un cambio en la fuerza de gravedad. En caso de que se observara alguna inestabilidad, se tendría que volver a reformular hasta obtener la estabilidad deseada en el producto. Para esto, se colocaron las muestras de las tres formulaciones en baño maría a una temperatura de aproximadamente 40°C y se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 minutos. La emulsión liposomada dió alguna señal de inestabilidad. Mientras que el hidrogel y la emulsión resultaron estables. Estos resultados de centrifugación nos dan un indicio de que la emulsión y el hidrogel son estables. Sin embargo la emulsión liposomada se descarta debido a la presencia de precipitados tras centrifugación y de grumos de la muestra en reposo.



Figura 24. Aspecto de la Emulsión liposomada tras centrifugación

5.3. Determinación de pH

Debido a que el pH bucal en la edad adulta es de 5.5-7 las formulaciones debían cumplir con este mismo rango de pH. Si no cumplía con el rango establecido, se debía hacer un ajuste con ácido cítrico para acidificar o con solución de hidróxido de sodio para alcalinizar. Es importante determinar el pH de cada formulación ya que al tener un pH fuera del rango especificado, se pueden producir reacciones alérgicas en la encía dejándola por ejemplo, sensible cuando se ha aplicado una formulación muy alcalina o producir rojez e inflamación cuando la formulación es muy ácida.

Aunque la Emulsión liposomada en el ensayo de centrifugación resultó ser inestable, se tomaron las medidas de pH de los tres desarrollos.

FORMULACIÓN	pH
Emulsión	5.95
Emulsión Liposomada	5.68
Hidrogel	5.53

Tabla 12. pH de las formulaciones

En la (Tabla 12. pH de las formulaciones se muestra la media de tres determinaciones de pH a las formulaciones definitivas, como se puede comprobar, todas las formulaciones presentan un pH idóneo para administrar por vía bucal. Dado que el pKa aproximado para la familia de polímeros de poli (ácido acrílico) está entre 4 y 5. La

fuerza adhesiva máxima de estos polímeros se observa alrededor de pH 4-5 y disminuye gradualmente por encima de un pH de 6. Como resultado teniendo en cuenta la compatibilidad de los pH con el ambiente bucal y con los requisitos para mantener la característica de mucoadhesividad las tres formulaciones han presentado un pH idóneo. También respetan el pH ideal de los activos incluidos en la formulación.

El pH en la interfaz bioadhesiva al sustrato puede influir en la adhesión de los bioadhesivos que poseen grupos ionizables. Muchos bioadhesivos utilizados en la administración de fármacos son polianiones que poseen funcionalidades de ácido carboxílico. Si el pH local está por encima del pKa del polímero, se ionizará en gran medida; Si el pH está por debajo del pKa del polímero, estará ampliamente desionizado. Algunos potenciadores de penetración comúnmente utilizados son las sales biliares, los ácidos grasos y el laurilsulfato de sodio.

El pH de la formulación a administrar es otro factor farmacéutico que debe considerarse durante la formulación de productos de administración bucal que contienen principios activos ionizables. El pH de la fórmula bucal debe estar cerca de un pH neutro ya que el pH de la saliva es de 6.6 a 7.4. Las grandes diferencias en el pH pueden causar irritación en el sitio de la mucosa.

5.4. Determinación de Viscosidad

La (Tabla 13. **Viscosidades, de las tres formulaciones**) muestra los valores de viscosidad, media de tres determinaciones para cada una de las fórmulas ensayadas. Como ya se comentó anteriormente en la descripción de las propiedades organolépticas, a simple vista, la formulación menos viscosa fue el hidrogel y la más viscosa fue la emulsión liposomada. La alta viscosidad de la emulsión liposomada puede deberse a la cantidad de polímeros que lleva en su formulación y al complejo de liposomas el cual también puede estar aportándole viscosidad. La emulsión puede considerarse de una viscosidad intermedia idónea para su aplicación, ya que una viscosidad elevada no permite una fácil aplicación localizada del producto, su extensibilidad es dificultosa, por el contrario, una formulación con baja viscosidad hace que los activos no permanezcan el tiempo suficiente en el sitio diana y por tanto no puedan proporcionar el efecto farmacológico deseado

FORMULACIÓN	VISCOSIDAD (mPa*s)
Emulsión	16401
Emulsión Liposomada	30932
Hidrogel	6789

Tabla 13. Viscosidades, de las tres formulaciones

5.5. Determinación de Extensibilidad

Para observar la extensibilidad de las tres formulaciones seleccionadas, se colocaron $300 \pm 0,200$ mg de cada formulación en un extensómetro. Las muestras se presionaron entre la superficie del extensómetro y la superficie de un vidrio graduado (peso del vidrio: 25g). Trasponer el vidrio encima de la preparación, se fueron colocando sucesivamente, en intervalos de 1 minuto, pesas de 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 y 1000 g. Para cada formulación, se determinaron los radios perpendiculares en cada uno de los intervalos de tiempo.

Se tomaron tres medidas para cada peso colocado sobre el vidrio. Los ensayos se realizaron evitando al máximo el deslizamiento del vidrio. Los resultados se expresaron como área de las superficies observadas. La (Tabla 14. Ensayo de Extensibilidad – Comparación entre formulaciones) muestra los resultados obtenidos.

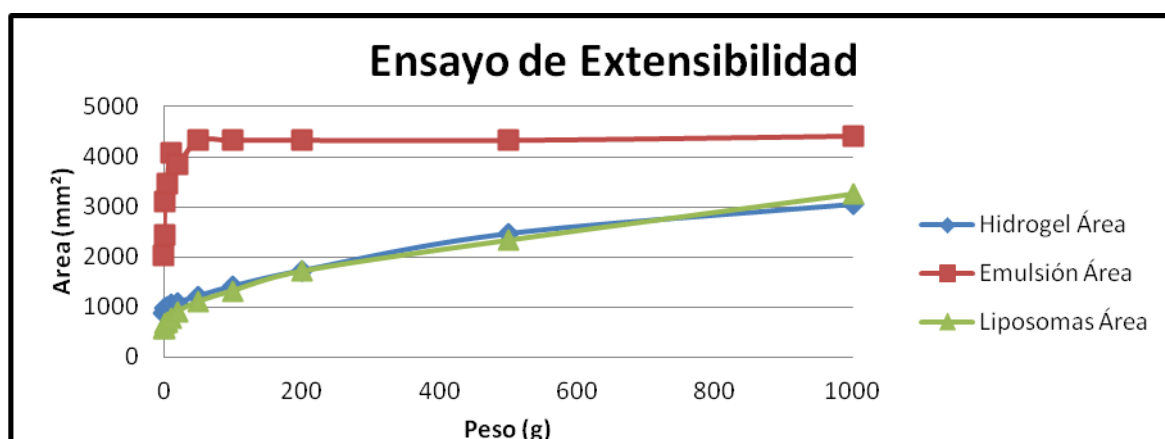


Tabla 14. Ensayo de Extensibilidad – Comparación entre formulaciones

El estudio de extensibilidad es importante realizarlo ya que no solo se pretende que este producto se vea agradable comercialmente sino también que no haya ausencia de discontinuidades al ser extendido durante su aplicación ya que si esto ocurre no se podría asegurar el contacto de sus principios activos en la superficie de la encía. La extensibilidad determina la disponibilidad y eficacia de los ingredientes activos de la fórmula tras su aplicación. La alta extensibilidad mejora la administración local de ingredientes activos y la unión de polímeros mucoadhesivos al tejido gingival. El hidrogel y la emulsión liposomada tenían una extensibilidad similar que aumentaba con un peso elevado a 3000 mm² aproximadamente con 1000 g de peso. La extensibilidad de la emulsión es la más elevada permaneciendo constante a partir de los 100 g de peso y alcanzando un valor por encima de 4000 mm²

En base a todos los estudios realizados y los resultados obtenidos, la Emulsión y el Hidrogel siguieron los adelante para evaluarlos con ensayos de estabilidad de corto y largo plazo.

5.6. Estudio de estabilidad previa

Para la realización de este estudio con la emulsión y el hidrogel, se pusieron muestras por triplicado de las mismas en frascos de plástico y en tubos de vidrio transparentes con tapa asegurando un buen cierre para evitar la pérdida de algún componente o la contaminación de la muestra. Se comprobó que la cantidad de muestra colocada en los frascos fuera suficiente para realizar los análisis necesarios, que no existiera algún componente de la formulación que fuera incompatible con el plástico y con el vidrio, y que hubiese un espacio vacío en el recipiente con muestra (aproximadamente un tercio de la capacidad del frasco) para posibles intercambios gaseosos.

- La primera muestra se colocó en un tubo de vidrio. Se midió el pH y la viscosidad inicial de cada formulación. Posteriormente el tubo se cerró bien y se llevó a congelación (temperatura: -4 °C) durante 24 horas. A las 24 horas, se sacó el tubo del congelador y se almacenó a temperatura ambiente otras 24 horas. Pasadas estas 24 horas, el tubo se volvió a llevar al congelador y se volvió a repetir el ciclo de congelar y descongelar por 24 horas hasta completar 3 ciclos. Cumplidos los 3 ciclos, a los 7 días, se volvió a analizar el pH y la

viscosidad para determinar la estabilidad de cada producto. El tubo se almacenó a temperatura ambiente (25°C) para volver a tomar datos de pH y viscosidad a los 15 y a los 30 días.

- La segunda muestra se colocó en un frasco de plástico con tapa y se utilizó como reserva para realizar los análisis de caracterización, liberación, permeación, actividad y estabilidad del factor de crecimiento epidérmico utilizando las células de Franz, el espectrofotómetro y los cultivos celulares.
- La tercera muestra se colocó en otro frasco de plástico con tapa y se almacenó como muestra comparativa.

5.6.1. Estudio de estabilidad previa Emulsión

Para determinar la estabilidad de la emulsión, en los ciclos de congelación y descongelación citados anteriormente (ciclos de 24 horas a temperatura ambiente y 24 horas a -4°C), se realizaron durante todo el tiempo que duró el ensayo observaciones periódicas sobre las características organolépticas (aspecto, color, olor, textura y sensación al aplicarlo), se tomaron medidas de pH (Tabla 12. pH de las formulaciones el día que se preparó la formulación, a los 7, a los 15 y a los 30 días. Durante este periodo la muestra estuvo sometida a las condiciones de congelación/descongelación, explicadas en la metodología. Como se puede observar, no se observaron variaciones significativas de pH y se obtuvieron valores en torno a 5.9 ± 0.1 . Al ser este un producto de uso tópico gingival, los valores obtenidos de pH a través del tiempo son idóneos para su uso.

Por otro lado, en la (Tabla 15. Ensayos de estabilidad previa Emulsión), se puede observar que la viscosidad aumenta con el tiempo. Esto puede ser debido a que ácido hialurónico, al ser una sustancia tixotrópica, cuando se le aplica una fuerza de cizallamiento, su viscosidad disminuye pero al dejarlo en reposo vuelve a recuperar su viscosidad. Esta recuperación puede tardar horas, semanas o incluso meses. Por lo tanto estos resultados son lógicos ya que como en el tiempo 0, la muestra estaba recién agitada, había sufrido una fuerza de cizallamiento muy alta y con el tiempo, por la ausencia de esta fuerza su viscosidad va aumentando hasta estabilizarse.

El comportamiento tixotrópico puede observarse cuando se aplica manualmente ya que al frotar un poco se observa una disminución en la viscosidad que lo hace más fácil de extender, pero una vez se deja de masajear, se va haciendo menos fluido lo que puede

ser interesante en el caso que nos ocupa, ya que permite que los principios activos puedan quedarse durante un tiempo adecuado en el lugar de aplicación y así permitir la acción de la proteína.

Tiempo (días)	pH	Viscosidad (mPa*s)
Inicial	5.95	16401
7	5.84	16755
15	5.86	17504
30	5.87	18917

Tabla 15. Ensayos de estabilidad previa Emulsión

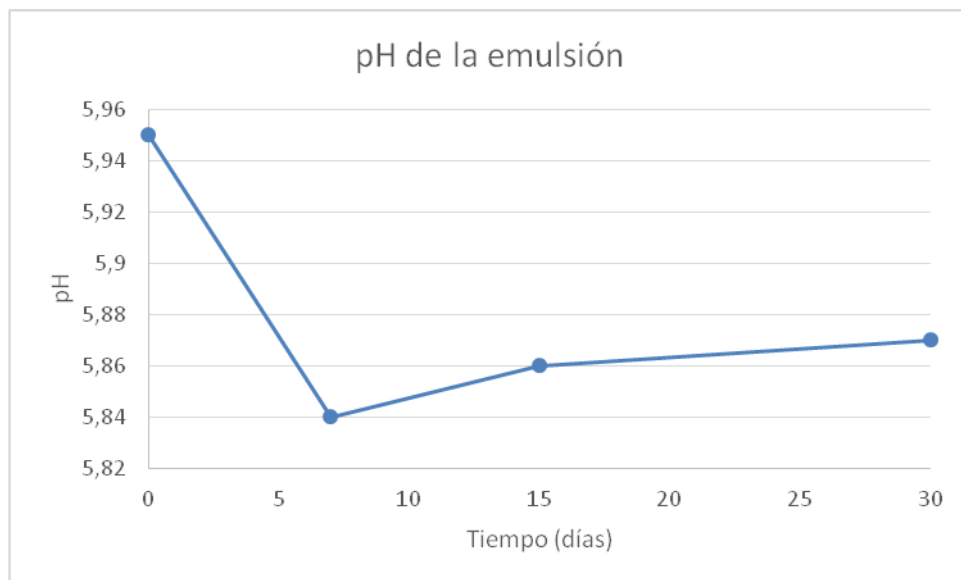


Figura 25. Valores de pH de la emulsión a diferentes tiempos

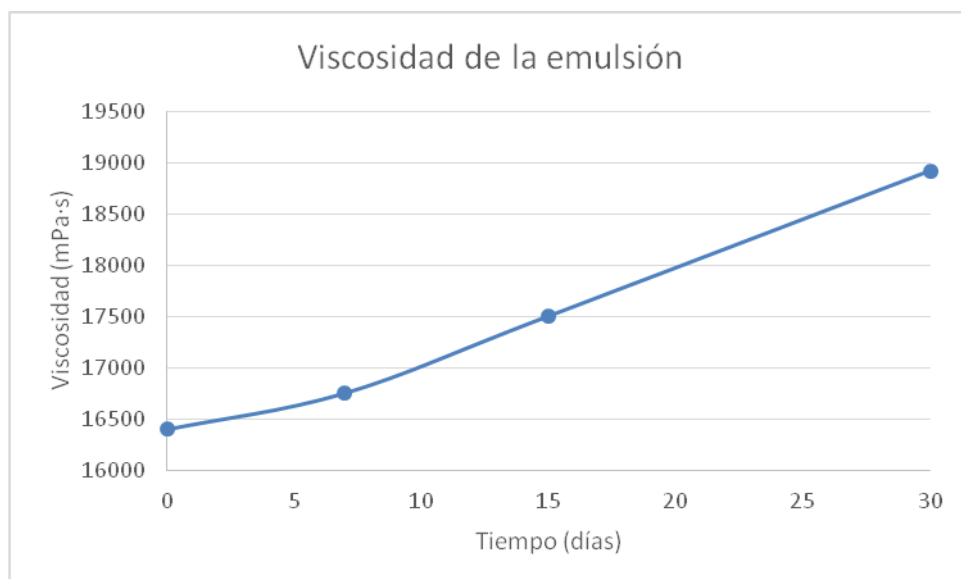


Figura 26. Valores de viscosidad de la emulsión a diferentes tiempos

El aspecto, la extensibilidad y la viscosidad que nos predice su grado de mucoadhesión son esenciales para el diseño de formulación galénica a la que va a ir destinada, es por ello que a esta formulación se le continuaron haciendo el resto de estudios de estabilidad.

5.6.2. Estudio de estabilidad previa Hidrogel

Para determinar la estabilidad del hidrogel, se procedió con el mismo protocolo anterior aplicado para la emulsión. En los ciclos de congelación y descongelación citados anteriormente se realizaron durante todo el tiempo que duró el ensayo observaciones periódicas sobre las características organolépticas (aspecto, color, olor, textura y sensación al aplicarlo), se tomaron medidas de pH (Tabla 16. Ensayos de estabilidad previa Hidrogel) el día que se preparó la formulación, a los 7, a los 15 y a los 30 días. Durante este periodo la muestra estuvo sometida a las condiciones de congelación/descongelación, explicadas en la metodología. Como se puede observar, no se observaron variaciones significativas de pH y se obtuvieron valores en torno a 5.5 ± 0.1 . Al ser este un producto de uso tópico gingival, los valores obtenidos de pH a través del tiempo son idóneos para su uso.

Tiempo (días)	pH	Viscosidad (mPa*s)
Inicial	5.53	6789
7	5.56	6890
15	5.49	6650
30	5.52	6670

Tabla 16. Ensayos de estabilidad previa Hidrogel

Por otro lado, en la Figura 28. **Valores de viscosidad del hidrogel a diferentes tiempos**, se puede observar que la viscosidad aumenta ligeramente en la medida a los 7 días pero en el punto de 30 días disminuye. Esto puede ser debido a que la formulación al ser prevalentemente acuosa con el tiempo y aplicando ciclos de calor y frío se ha visto afectada. Una mayor viscosidad se da cuando el agua es limitada en el sistema debido a un aumento en la elasticidad, causada por la formación compleja entre el activo y los polímeros. Se han encontrado estudios en los que mientras se formulaba en

presencia de grandes cantidades de agua, el complejo activo-polimeros precipita, lo que conduce a una ligera disminución en el carácter adhesivo y su viscosidad (110).

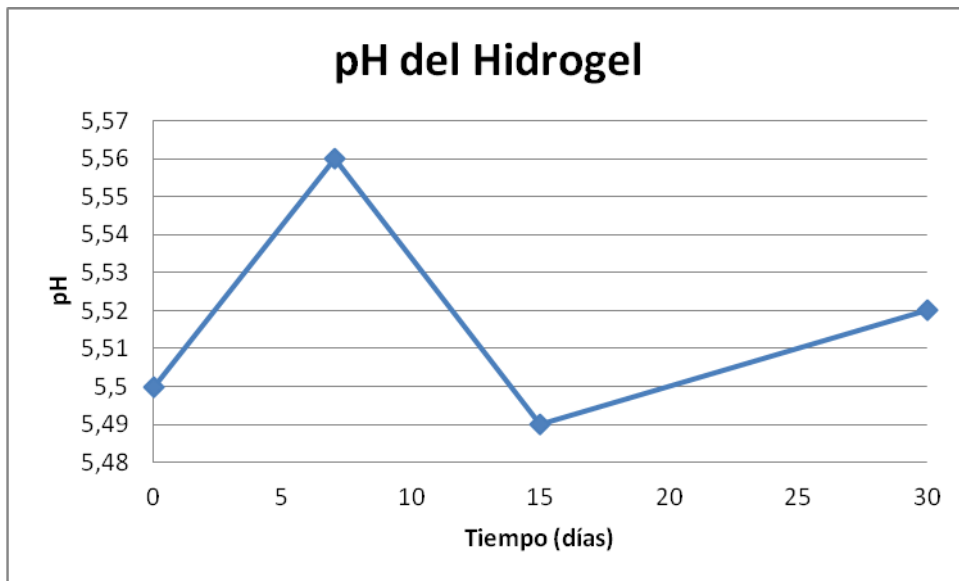


Figura 27. Valores de pH del hidrogel a diferentes tiempos

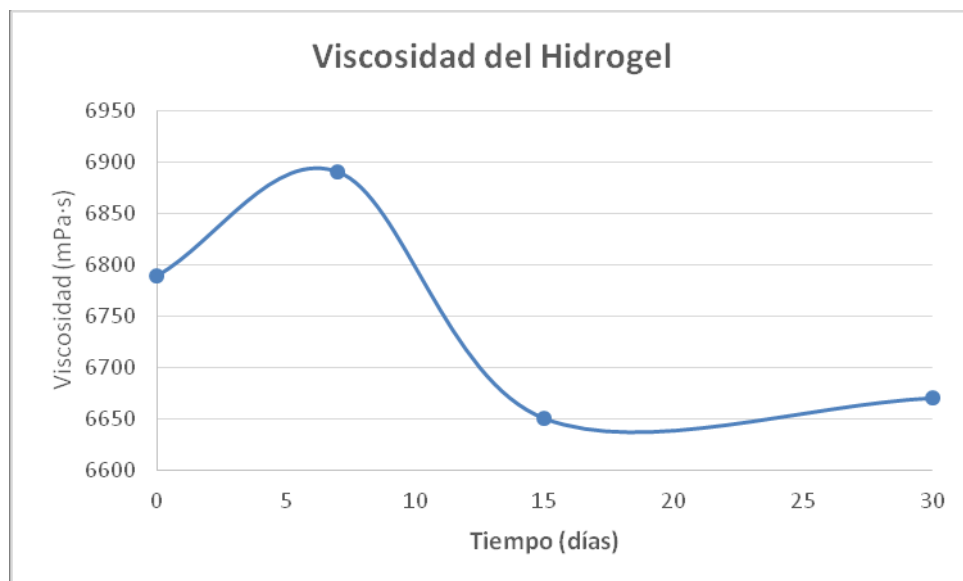


Figura 28. Valores de viscosidad del hidrogel a diferentes tiempos

Por las constantes que presentó el hidrogel durante el estudio de estabilidad previa, se seleccionó para seguir adelante con los estudios de corto y largo plazo.

5.6.3. Estudio de Estabilidad Corto Plazo Hidrogel

La vida útil implica el período de tiempo en que el producto mantiene sus propias actividades, funciones y propiedades físico-químicas, y aún es seguro para la salud humana, mediante el ensayo descrito anteriormente, el aspecto, y el pH no sufren apenas modificación alguna desde el momento de su preparación, sin embargo es la viscosidad ha dado una ligera variación.

La estabilidad de corto plazo (3 meses) nos da un indicio más acertado de la capacidad de la formula de mantener sus propiedades en el tiempo tras ser sometida a determinadas condiciones de estrés.

Para el hidrogel durante los 90 días de estudio se estudiaron las constantes físico químicas y microbiológicas.

El pH, viscosidad y espectro infrarrojo resultaron mantener valores dentro de especificaciones.

TIEMPO	pH	VISCOSIDAD	IR	CONSTANTES MICROBIOLÓGICAS
Inicial	5.57	6789	1	TAMC: <100 UFC/g o ml TYMC: <100 UFC/g o ml
15 Días	5.41	6650	0.994	N/A
30 Días	5.55	6670	0.993	N/A
60 Días	5.55	6230	0.999	N/A
90 Días	5.47	5960	0.998	TAMC: <100 UFC/g o ml TYMC: >100 UFC/g o ml

Tabla 17. Estudio de estabilidad a corto plazo Hidrogel

A los 90 días microbiológicamente presentó contaminación por hongos y levaduras en el recuento total. Por lo que la formulación se excluyó del estudio. También al mismo tiempo se dieron por finalizados los estudios de largo plazo.

5.6.4. Estudios de Estabilidad Corto Plazo Emulsión

La emulsión mantuvo unos valores de los parámetros estudiados dentro de especificación durante el estudio de estabilidad previa. El aspecto, y el pH no sufrieron apenas modificación alguna desde el momento de su preparación, sin embargo es la viscosidad la que se incrementa ligeramente a lo largo del tiempo de ensayo, manteniéndose en rangos, debido a la propiedad tixotrópica del ácido hialurónico. Esta característica permite una fácil aplicación en la encía y la retención de principios activos cuando está en condiciones estáticas, aumentando así el tiempo de exposición y la eficacia potencial. La emulsión se presentó como la candidata para seguir adelante con los estudios de corto y largo plazo y aplicarla posteriormente a los pacientes voluntarios del estudio *in vivo* planteado en este proyecto. En la (Tabla 18. Estabilidad a corto plazo Emulsión) se recogen los datos resultantes durante el estudio de corto plazo cuya duración fue de 3 meses en condiciones de estrés ambiental como se especificó en el apartado 4.2.8. en estufas de $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ y con 75% de humedad, durante el cual se han medido en 5 diferentes puntos las constantes establecidas. La emulsión resultó mantenerse estable durante los 90 días en todos los parámetros estudiados.

TIEMPO	pH	VISCOSIDAD	IR	CONSTANTES MICROBIOLÓGICAS
Inicial	5.75	16401	1	TAMC: <100 UFC/g o ml TYMC: <100 UFC/g o ml
15 Días	5.82	17504	0.985	N/A
30 Días	5.83	18917	0.994	N/A
60 Días	5.82	18120	0.998	N/A
90 Días	5.86	17610	0.995	TAMC: <100 UFC/g o ml TYMC: <100 UFC/g o ml

Tabla 18. Estabilidad a corto plazo Emulsión

5.6.5. Estabilidad Largo Plazo Emulsión

Paralelamente cuando la muestra entra en estufas de estabilidad de corto plazo, entra también en la estufa de largo plazo. Durante 5 años se medirán los parámetros especificados en la estabilidad de corto plazo o acelerada. Las condiciones ambientales como anteriormente se ha comentado en el apartado 4.2.8 han sido de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y 60% de

humedad. Durante ese tiempo para la emulsión se han obtenido 9 puntos de medidas en el cual mantuvo todas sus constantes dentro de especificaciones. Por lo cual resulta ser una formula estable con una caducidad de 4 años.

TIEMPO	pH	VISCOSIDAD	IR	CONSTANTES MICROBIOLÓGICAS
Inicial	5.95	16401	1	TAMC: <100 UFC/g o ml TYMC: <100 UFC/g o ml
3 meses	5.86	17610	0.993	TAMC: <100 UFC/g o ml TYMC: <100 UFC/g o ml
6 meses	5.96	17430	0.994	N/A
9 meses	6.01	17520	0.995	N/A
12 meses	5.69	17700	0.994	N/A
18 meses	5.71	17985	0.986	N/A
24 meses	5.90	18010	0.995	TAMC: <100 UFC/g o ml TYMC: <100 UFC/g o ml
36 meses	5.87	18150	0.994	N/A
48 meses	5.94	18345	0.994	N/A
60 meses	-----	-----	-----	-----

Tabla 19. Estabilidad largo plazo Emulsión

Una vez realizados estos estudios de estabilidad previa, corto y largo plazo era necesario en el trabajo de investigación diseñado el determinar, si el activo incorporado podía liberarse del excipiente en el que se encuentra, para ello, se procede en primer lugar a poner a punto el método de valoración para posteriormente proceder al estudio de liberación y permeación utilizando las células de Franz y seleccionando la membrana adecuada en cada caso.

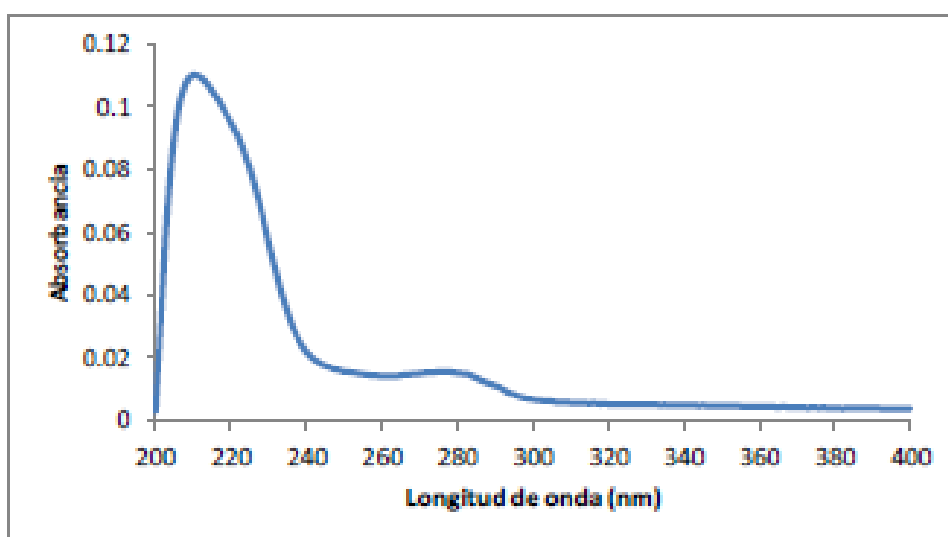
5.7. Valoración del factor de crecimiento epidérmico

Las medidas se han llevado a cabo utilizando un espectrofotómetro Pelkin-Elmer UV/Vis Lambda 40. Dicho método se ha empleado con el objetivo de:

- Determinar el espectro de absorción de la proteína, obteniendo así la longitud de onda donde se produce la máxima absorción.

- Obtener la recta de calibrado de la proteína. para poder posteriormente utilizarla cuando se obtengan las muestras de liberación/permeación.

Para la obtención del espectro correspondiente, se utiliza una solución de 10 ml proteína en tampón pH 7.4 a una concentración de 10 ppm y se realizó un barrido desde 200 a 400 nm (Figura 29. Espectro de absorción del EGF (10ppm). para determinar el pico de máxima absorción, y utilizar el valor de la máxima longitud de onda para elaborar la recta de regresión correspondiente. Al realizar el espectro, no debe olvidarse que la proteína es un compuesto muy complejo, de tal forma que se conoce que los residuos de cadenas laterales aromáticas (Trp, Tyr y Phe) de la superficie de las proteínas tienen absorbancia UV en la región de 240-300 nm (111). La superficie de EGF tiene residuos de tirosina (Tyr13 y Tyr37) (65)(112), que pueden tener un pico de absorbancia a 275 nm cuando el pH es neutro. Por lo tanto, dimos por bueno, que el pico de absorbancia UV-VIS de EGF era de 275 nm, aunque el espectro ultravioleta del EGF mostró una baja intensidad de absorbancia a 275 nm y un pico algo mayor a 220 nm. El pico más bajo a 275 nm puede deberse a una baja concentración de proteínas y un bajo poder de absorción de la tirosina. El pico alto a 210 nm, es un valor próximo a 200 nm puede dar lugar a error, ya que lo ideal es que aparezca una absorbancia máxima a partir de los 230 nm.



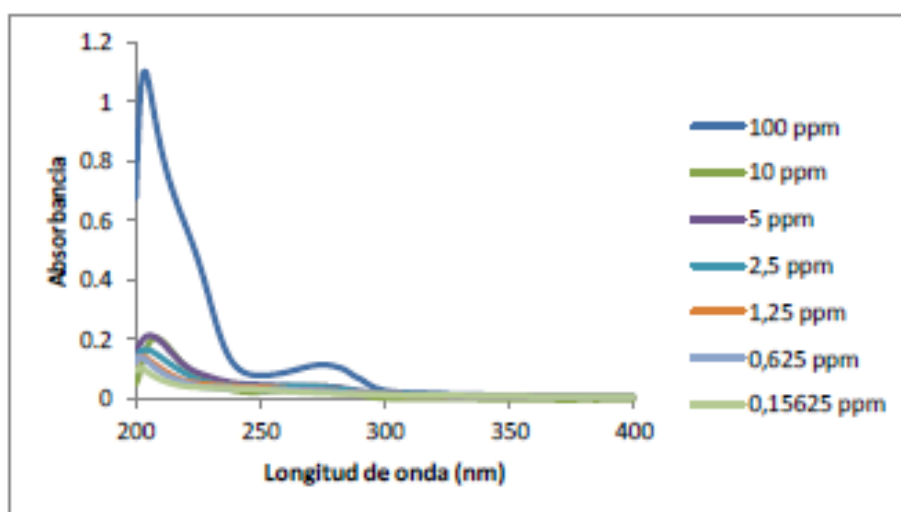
Espectro de absorción de proteína 10 ppm.

Figura 29. Espectro de absorción del EGF (10ppm).

A continuación, se realizaron espectros de la proteína Figura 30. Espectros de la proteína a distintas concentraciones, (Tabla 20. Valores de absorbancia para las concentraciones de proteína) para elaborar la recta de regresión correspondiente.

Concentración (ppm)	Absorbancia
100	0.1121
10	0.0403
5	0.0388
2,5	0.036
1,25	0.0223
0,625	0.0222
0,15625	0.0173

Tabla 20. Valores de absorbancia para las concentraciones de proteína



Espectro de la proteína a diferentes concentraciones.

Figura 30. Espectros de la proteína a distintas concentraciones

Se observa la similitud de las muestras a bajas concentraciones obteniendo un espectro más diferenciado y con mayores absorbancias en la concentración de 100 ppm.

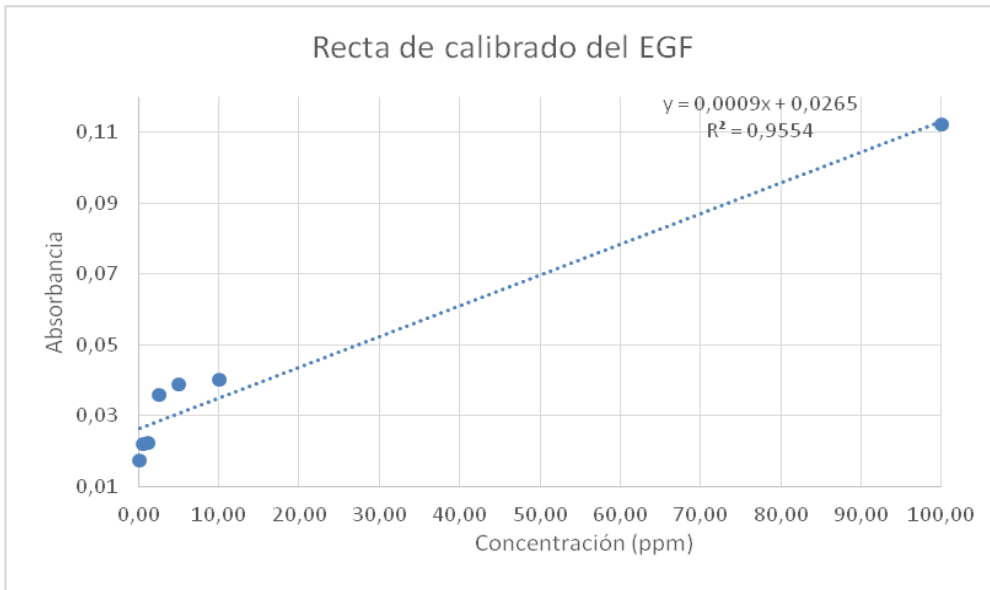


Figura 31. Recta de Calibrado EGF

La ecuación obtenida fue: $Y = 0.0009X + 0.0265$. Con un coeficiente de regresión ($R^2 = 0.9554$).

5.8. Estudio de Cesión/Permeación con Células de Franz

Para determinar la cesión/permeación del factor de crecimiento epidérmico se utilizan en el primer caso membrana sintética, concretamente de nylon y en el segundo piel de pollo, y se realizó todo el proceso de acuerdo con la descripción del método descrito en el apartado 4.2.5. Se preparan dos emulsiones una con EFG y la otra sin él, y se toman muestras en tiempos diferentes, todas las muestras obtenidas en este ensayo se analizan por espectrofotometría.

Se hicieron estos dos controles diferentes para saber con precisión si la actividad regenerativa de la formulación que posteriormente se iba a observar en vivo, se debe únicamente al factor de crecimiento epidérmico o si el ácido hialurónico también ayuda de alguna forma en conseguir el efecto deseado.

La concentración de EGF en los ensayos de cesión y permeación se calculó con la ayuda de la ecuación de la recta.

En la (Tabla 21. **Concentraciones de EGF en los ensayos de cesión y permeación**) se muestran los resultados obtenidos en ambos ensayos para distintos tiempos ensayados.

	Tiempo	Absorbancia 275 nm Control	Absorbancia 275 nm Emulsión	Absorbancia 275 nm EGF	Concentración EGF (ppm)
Cesión Nylon	30 min	0.0132	0.0411	0.0279	$1.26 \cdot 10^6$
	3 horas	0.0498	0.0949	0.0451	$1.67 \cdot 10^5$
	24 horas	0.1287	0.4118	0.2831	$2.31 \cdot 10^4$
Permeación	30 min	0.0173	0.1039	0.0866	$5.41 \cdot 10^5$
	3 horas	0.0257	0.2179	0.1922	$1.49 \cdot 10^4$
	24 horas	0.2421	0.9457	0.7036	$6.09 \cdot 10^4$

Tabla 21. Concentraciones de EGF en los ensayos de cesión y permeación

La absorbancia en las alícuotas en blanco y en emulsión fue mayor en la membrana de piel de pollo que en la membrana de nylon. Para la membrana de nylon, la concentración de EGF aumentó con el tiempo, no pudimos obtener valor alguno a los 30 minutos, pero la concentración encontrada fue de $1.67 \cdot 10^5$ ppm a las 3 horas y $2.31 \cdot 10^4$ ppm a las 24 horas (Tabla 21. Concentraciones de EGF en los ensayos de cesión y permeación) Cuando se realiza la cesión, utilizando la piel de pollo, obtenemos a los 30 minutos una concentración de $5.41 \cdot 10^5$, pero después de 3 horas, la concentración aumentó $1.49 \cdot 10^4$ y a las 24 horas fue $6.09 \cdot 10^4$.

La baja concentración de proteínas nos hizo pensar en la baja sensibilidad del método de medida para la proteína.

La cesión de la emulsión aumentó con el tiempo de exposición; la intensidad de la absorbancia apenas se apreció a los 30 minutos pero si aumentó un poco a las 3 y 24 horas en ambos ensayos. Los espectros de la preparación, cuando se utilizó la membrana de nylon tienen un contorno similar al espectro de la solución de EGF. Sin embargo, los espectros de la preparación cuando se utilizó la piel de pollo como membrana para el estudio de cesión, son algo diferentes, probablemente debido a la complejidad de la membrana empleada, pensamos que posiblemente la composición de El aumento de la intensidad de absorbancia en el intervalo de 275 nm tanto en los espectros de cesión como de permeación podría estar relacionado con la desnaturalización de EGF. La membrana puede alterar la estructura de la proteína, y

serían los residuos de cisteína con sus enlaces disulfuro internos los que darían lugar a la absorción observada a 260 nm, como otros autores han confirmado en estudios similares (113) (114).

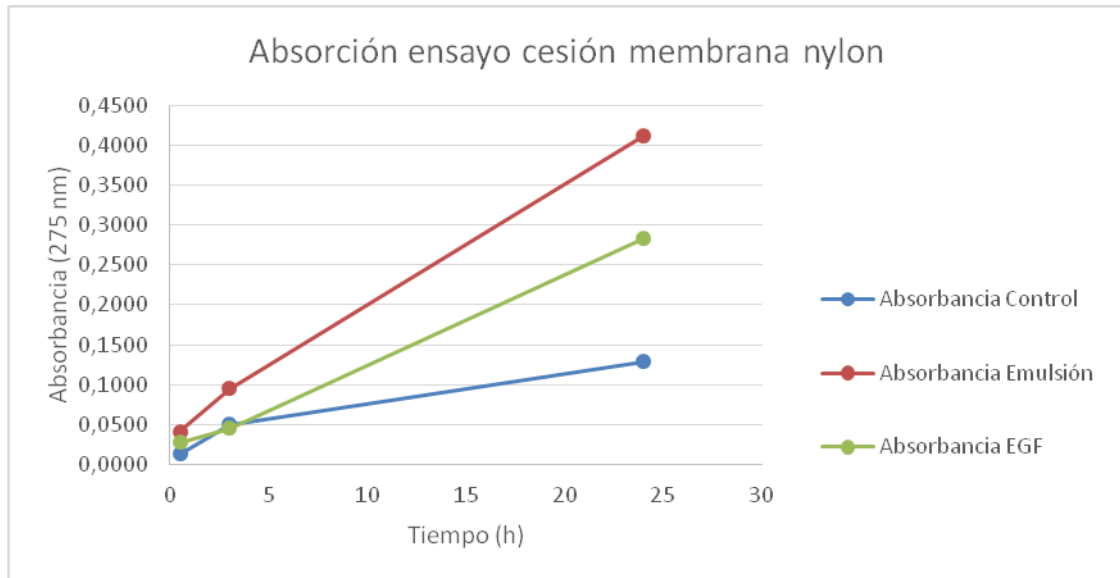


Figura 32. Absorción de alícuotas en tres puntos a 275 nm en el ensayo de cesión.

La absorbancia en las alícuotas del blanco y de la emulsión fue mayor utilizando la membrana de la piel de pollo que cuando se empleó la membrana de nylon. La concentración de EGF en alícuotas a los 30 minutos no se pudo medir, dada las bajas concentraciones que podrían haberse liberado (Figura 32. Absorción de alícuotas en tres puntos a 275 nm en el ensayo de cesión).

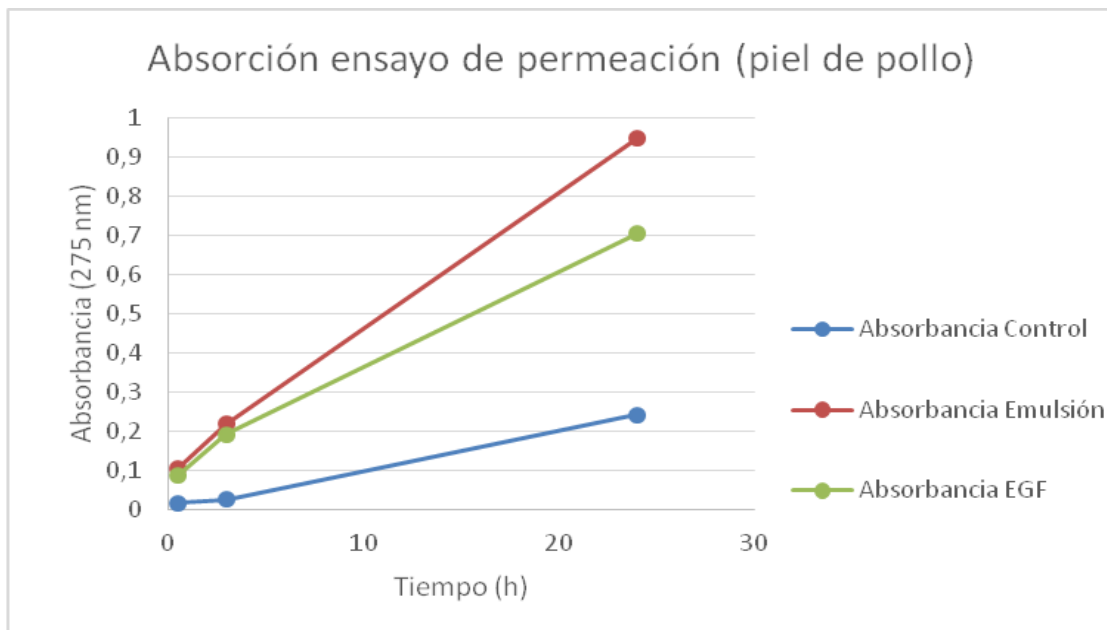


Figura 33. Absorción de alícuotas de tres puntos a 275 nm en el ensayo de permeación.

La permeación global de la emulsión aumenta con el tiempo de exposición de la fórmula. La penetración específica de EGF tiene una cesión máxima a las 24 horas. Los datos obtenidos, nos pueden indicar que cuando utilizamos como membrana la piel de pollo la penetración de la proteína es mayor que cuando se emplea la membrana de nylon, pero podría ser proteína degradada o un falso positivo (proteínas residuales de la mucosa). Se requieren más experimentos para analizar la vida útil y la integridad de EGF después de atravesar la membrana de la piel de pollo.

Por otro lado, los resultados obtenidos en los ensayos de cesión y permeación nos indican la dificultad de valoración de la proteína por espectrofotometría, es por ello que para confirmar los resultados obtenidos, hemos recurrido a la realización del estudio *in vitro*.

5.9. Estudio *in vitro* utilizando cultivos celulares

La importancia de los estudios de viabilidad celular '*in vitro*' radica en evaluar si los productos utilizados en una formulación pueden o no ser citotóxicos para las células, o por el contrario pueden favorecer el crecimiento de las mismas, de esta forma puede obtenerse información acerca de su biocompatibilidad. En nuestro caso, con la formulación ensayada, se ha pretendido conocer si el activo incluido en la formulación puede favorecer el crecimiento celular y en que medida lo hace. El objetivo y justificación de este estudio, reside en analizar la efectividad que un activo puede presentar en el organismo vivo mediante la evaluación del número de unidades celulares vivas a lo largo del tiempo de contacto con el preparado. Como se ha explicado en el apartado de materiales y métodos, el estudio de viabilidad celular consiste en medir la absorción que presentan las distintas muestras analizadas, en nuestro caso ha sido una preparado sin EFG (blanco), y dos preparados con EFG, uno recién preparado y otra con un tiempo de envejecimiento de 3 años.

En la (Tabla 22. Número de células encontrado en las tres formulaciones y el valor promedio en cada caso) y Figura 34. Microfotografías del crecimiento celular experimentado con la formulación aplicada (A) blanco; (B) 3 años y (C) recién preparada se puede observar el crecimiento celular experimentado tanto con el blanco (A), como con la formulación 3 años (B) y con la recién preparada (C)

Número de células		
Blanco (A)	Formulación 3 años (B)	Formulación recién preparada (C)
162	318	394
178	315	384
201	311	370
197	297	380
185	301	362
188	325	389
Promedio: 185	Promedio: 311	Promedio: 380

Tabla 22. Número de células encontrado en las tres formulaciones y el valor promedio en cada caso

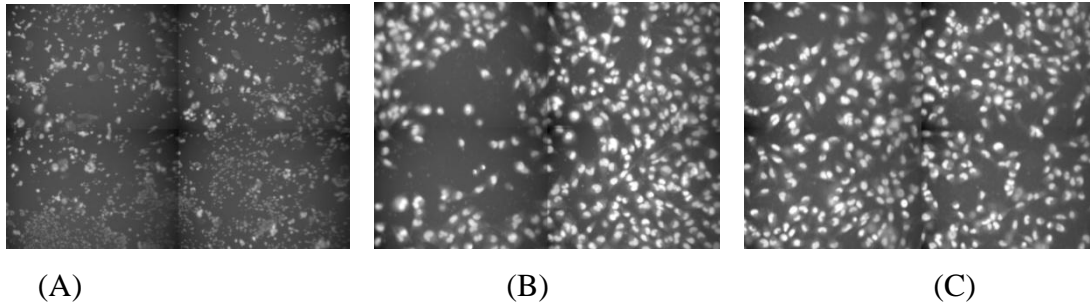


Figura 34. Microfotografías del crecimiento celular experimentado con la formulación aplicada (A) blanco; (B) 3 años y (C) recién preparada

Se puede afirmar ante estos resultados que con estos ensayos in vitro se comprueba un crecimiento celular, en este caso, el crecimiento observado con respecto al blanco es de un 68% en la fórmula de 3 años de antigüedad y de un 105% en la formulación recién preparada. Nuestro objetivo era el poder determinar si el factor EFG de alguna forma contribuye al crecimiento celular, y efectivamente si lo hace, aunque hay que destacar como el paso del tiempo también influye, llegando a afectarle negativamente.

5.10. Estudio Microbiológico

Como se ha comentado con anterioridad, (apartado 4.2.5) son necesarios para confirmar la estabilidad de la formulación y poder comprobar la presencia o ausencia de microorganismos. Los resultados de este análisis de determinación de patógenos se expresarán siempre como Ausencia o Presencia de *microorganismo* en 1 ml de producto.

La emulsión que ha sido analizada microbiológicamente en todos los puntos de nuestro analíticos de estabilidad de corto y largo plazo ha resultado conforme en todos los patógenos estudiados.

Aerobios:

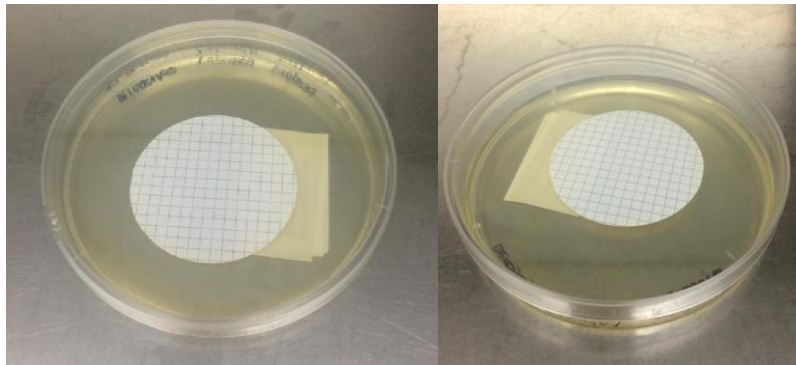


Figura 35. Inicio y fin análisis microbiológico ensayo aerobios

Ausencia total de microorganismos aerobios

Hongos:

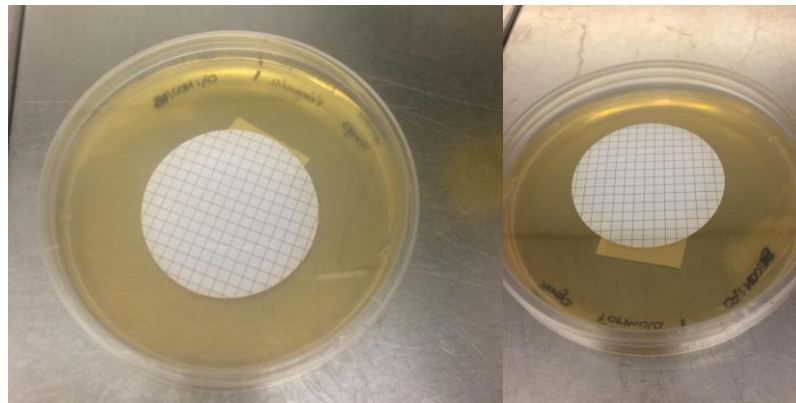


Figura 36. Inicio y fin análisis microbiológico Inicio y fin hongos

Ausencia total de hongos al sembrar y tras incubación a 37°C durante 7 días

Escherichia coli:



Figura 37: Inicio y fin análisis microbiológico *E.Coli*

Ausencia total.

Candida albicans:

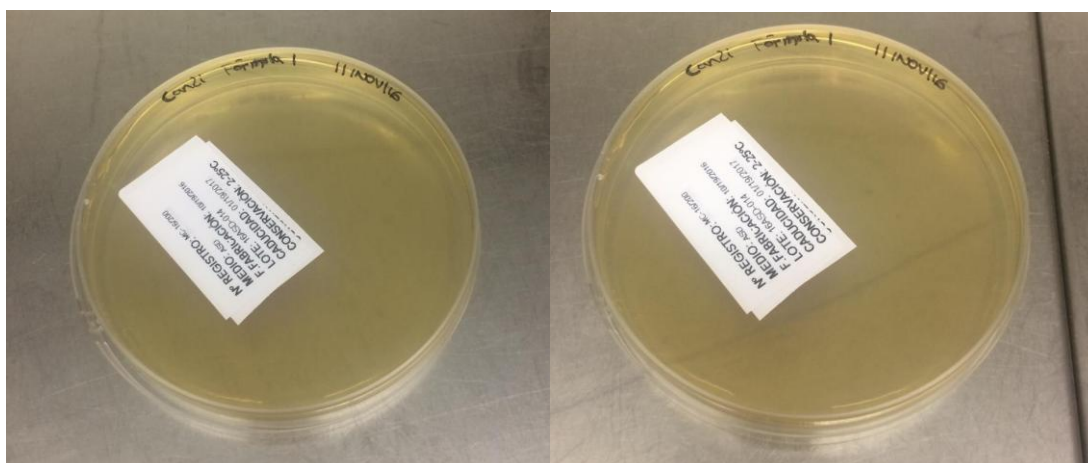


Figura 38. Inicio y fin análisis microbiológico *Candida Albicans*.

Ausencia total

Staphylococcus aureus y *Pseudomonas aeruginosa*



Figura 39: Inicio y fin análisis microbiológico *S.Aureus* y *P. Aeruginosa*

Ausencia

El sistema conservante empleado ha sido eficiente para garantizar un control microbiológico óptimo, obteniendo ausencia total de contaminación de los patógenos estudiados.

Podríamos resumir todos los estudios realizados en el apartado de diseño de las formulaciones, indicando que las propiedades físico-químicas y organolépticas de una formulación semisólida son esenciales en el diseño de fórmulas. Los polímeros empleados con características de mucoadhesión proporcionan una extensibilidad y viscosidad apropiadas para controlar la liberación del ingrediente activo y la adhesión a la superficie de contacto. El diseño de la formulación incluye la evaluación y el cribado

de la estabilidad así como la eficacia de la bioactividad, por tanto una formulación estable es fundamental para mantener la efectividad del tratamiento.

En base a todo ello es por lo que se seleccionó la emulsión para su posible uso en el tratamiento de periodontitis, para ello se plantea un estudio piloto controlado aleatorio. descrito en el apartado anterior 4.4.

5.11. Resultados y discusión estudio clínico

5.11.1. Estadísticas

Las variables descriptivas analizadas fueron sexo, edad, uso de otro producto, o medicamento, consumo de tabaco y alcohol, higiene bucal, bruxismo. Las variables de resultado fueron PD, ACL y CAL. Las variables fueron analizadas por el software SPSS v22.

– Estadística descriptiva

Se realizaron análisis a cada variable experimental. Media estándar, La desviación y la mediana se calcularon para todas las variables clínicas. Esta el estudio se analizó según prueba no paramétrica (prueba de Wilcoxon y prueba de Mann- Test de Witney) debido a que no hay datos normales y al tamaño de la población. Prueba de Wilcoxon se utilizó para comparar la significancia entre las diferencias de medias. La prueba de Mann-Witney (prueba U) se utilizó para analizar la importancia entre grupo 0 y grupo 1. La hipótesis nula del estudio es que no hay significancias estadísticas en los parámetros clínicos (CAL, longitud AC y PPD) entre el grupo 1 y el grupo 0. Un nivel de $\alpha \geq 0.05$ fue considerado significativo

Las frecuencias descriptivas de las variables se calcularon con los datos del paciente. información (Tabla 23. Frecuencias descriptivas de las variables).

Tabla 23. Frecuencias descriptivas de las variables			
VARIABLES	Frecuencias		
	Grupo0	Grupo1	
Nº	11	12	
Mujeres	8	11	
Hombres	3	1	
Fumador	3	1	
Consumidor de Alcohol	0	1	
Higiene Oral	2	2	
Frecuencia de lavado de dientes	Una vez al día	0	1
	Dos veces al día	2	3
	Tres veces al día	9	8
Uso de enjuague bucal	3	1	
Uso de hilo dental	10	9	
Bruxismo	3	5	
Apretador	4	6	
Diabete	0	0	
Hipertensión	0	0	
Osteoporosis	0	1	
Otras enfermedades sistémicas	2	1	
Número de black holes	1 Black hole	1	0
	2 black holes	1	1
	3 Black holes	3	5
	4 black holes	1	3
	5 black holes	5	0
	6 black holes	0	1
	7 black holes	0	1
	8 black holes	0	1

Los voluntarios fueron asignados de forma aleatoria al grupo 0 y el grupo 1 al azar. 8 mujeres y 3 hombres fueron incluidos en el grupo 0 y 11 mujeres y 1 hombre en el grupo 1. Los pacientes que consumían de tabaco y alcohol fueron mayores en grupo 0 que en el grupo 1. La mayoría de los pacientes solían cepillar los dientes tres veces al

día (9 pacientes en el grupo 0 y 8 pacientes en el grupo 1) y usaban habitualmente hilo dental (10 pacientes del grupo 0 y 9 pacientes del grupo 1). Solo un paciente tenía osteoporosis involucrada en agravamiento de periodontitis en el grupo 1. Las otras enfermedades sistémicas fueron artrosis (un paciente en el grupo 0), hipotiroidismo (un paciente en el grupo 0) y esclerosis múltiples (un paciente en el grupo 1). La mayoría de los pacientes tenían entre 3 a 5 defectos periodontales. En el grupo 0 había: un paciente con un agujero negro, un paciente con 2 agujeros negros y un paciente con 4 agujeros negros, tres pacientes con 3 agujeros negros y cinco pacientes con 5 agujeros negros. En grupo 1 había: un paciente con 2 agujeros negros, cinco pacientes con 3 agujeros negros, tres pacientes con 4 agujeros negros, un paciente con 6 agujeros negros, un paciente con 7 agujeros negros y un paciente con 9 agujeros negros. Se calcularon las diferencias medias de muestras de pares para variables de (PD, ACL y CAL). Las muestras de pares se consideraron las diferencias entre los datos iniciales y los datos de 3 meses (denominado I-3P), entre los datos iniciales y datos de 6 meses (llamado I-6P) y entre datos de 3 meses y datos de 6 meses (llamado I-36P). Para el parámetro de Profundidad de sondaje (PD) el resultado a los 3 meses (I-3P) en el grupo 0 fue -0.5526 ± 0.4157 mm. Para el PD a los 6 meses (I-6P) el promedio fue -0.7949 ± 0.4690 . La media de PD desde el tercer mes hasta el sexto mes (I-36P) fue -0.2500 ± 0.3811 . La media del grupo 1 en el parámetro de profundidad de sondaje (PD) a los 3 meses (I-3P) fue -0.6471 ± 0.5941 . Siempre en el grupo 1 el PD a los 6 meses (I-6P meses) fue -0.8824 ± 0.7719 . En la profundidad de sondaje PD en el grupo 1 la media obtenida entre el tercer y el sexto mes (I-36P) fue -0.2353 ± 0.3918 . En el grupo 0 la media del parámetro de longitud del crecimiento de la cresta alveolar de (ACL) a los 6 meses (I-6P) fue 0.9962 ± 2.1551 y para el grupo 1 fue 1.4089 ± 1.9166 . La Pérdida de inserción clínica (CAL) a los tres meses (I-3P) para el grupo 0 fue -0.2326 ± 0.3763 y para el grupo 1 fue -0.1159 ± 0.2569 . La media de CAL a los seis meses (I-6P) fue -0.3171 ± 0.4686 y para el grupo 1 fue -0.3466 ± 0.4373 . La media de CAL obtenida entre el tercer y el sexto mes (I-36P) fue -0.0778 ± 0.2416 ($P = 0.062$) para el grupo 0 y -0.2306 ± 0.4304 para grupo 1. La prueba de Wilcoxon fue significativa cuando ($P \leq 0.05$). Mann-Witney. La prueba (prueba U) indicó significancia entre los grupos. A los 6 meses en el grupo 1 la media fue mayor que la media del grupo 0 para PD ($P = 0.539$), ACL ($P = 0.333$) y CAL ($P = 0.880$) (Tabla 24. Resultados variables cambios después de 3 y 6 meses).

Tabla 24. Resultados variables cambios después de 3 y 6 meses					
Resultado variables	Grupo 0 (n=11)		Grupo 1 (n=12)		P (U test)
	Media ± SD	P (wilcoxon test)	Media ± SD	P (wilcoxon test)	
Profundidad de Sondaje (PD) (mm)					
I-3P	-0.5526± 0.4157	0.000	-0.6471 ±0.5941	0.000	0.451
I-6P	-0.7949± 0.4690	0.000	-0.8824 ±0.7719	0.000	0.539
I-36P	-0.2500±0.3811	0.001	-0.2353±0.3918	0.000	0.970
Longitud del crecimiento de la cresta alveolar (ACL) (mm)					
I-6P	0.9962±2.1551	0.019	1.4089±1.9166	0.000	0.333
Perdida de inserción clínica CAL (mm)					
I-3P	-0.2326±0.3763	0.000	-0.1159±0.2569	0.000	0.880
I-6P	-0.3171±0.4686	0.000	-0.3466±0.4373	0.000	0.835
I-36P	-0.0778±0.2416	0.062	-0.2306±0.4304	0.000	0.136

El tamaño de la muestra del grupo 0 fue de 41 agujeros negros analizados. Por cada agujero negro PD, ACL y CAL se midió. Comparación de PD (mm) entre el tiempo inicial y 3 meses después del tratamiento y el tiempo inicial y 6 meses después tratamiento. La diferencia de la profundidad de sondaje fue mayor a los 6 meses. La población de I-6P tuvo un desplazamiento hacia el fondo con respecto a I-3P. En el Grupo 1 el tamaño de muestra fue de 50 agujeros negros. PD (mm) I-3P se coloca más abajo que PD I-3P grupo 0. I-6P se movía hacia abajo en comparación con I-3P del grupo 1. PD disminución de la EP demostrada con desplazamiento al final de IP-6p. Después de 6 meses, la disminución fue mayor en ambos grupos que después de 3 meses. En la Figura 40.Box plot Profundidad de sondaje. Figura 41 Box Plot CAL, CAL I-6P tuvo un desplazamiento hacia abajo respecto a I-3P pero la mediana de la población es la misma. CAL I-6P del grupo 1 es más disperso que I-3P.

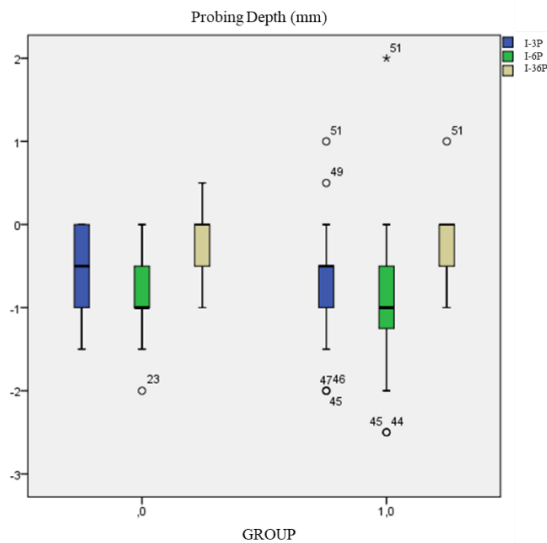


Figura 40.Box plot Profundidad de sondaje.

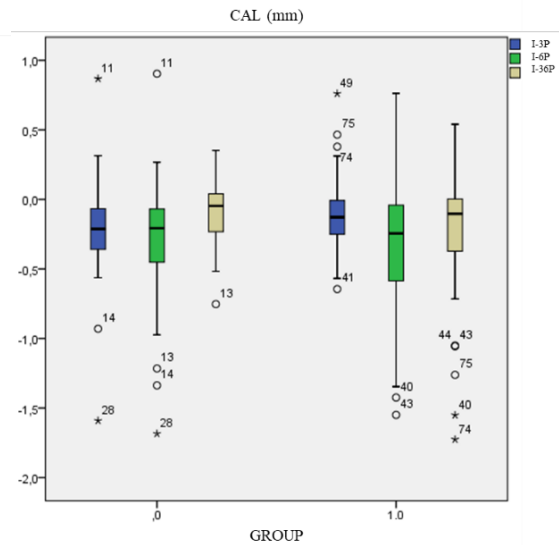


Figura 41 Box Plot CAL

El estudio clínico piloto ha permitido evaluar comparativamente la acción curativa con una emulsión control cuya composición es igual que la emulsión test a excepción del EGF que ha representado el elemento innovador. Dicha emulsión control contiene el HA al 1% ha sido comparada (Grupo 1) con emulsión de HA-EGF al 1% (grupo 0) en el tratamiento de defectos periodontales. El objetivo es demostrar que EGF se combinado con HA aumenta la curación periodontal. En anteriores estudios de Andra Piloni y col (115) se estudió la aplicación de un gel de HA como método de tratamiento para periodontitis regenerativa. Los resultados de Piloni muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas entre el gel HA después de los tratamientos de periodontitis SRP (raspado) y SRP solamente (53) (41). Yi Xu y col. determinaron que el gel de HA al 0.2% no tiene parámetros clínicos de periodontitis mejorados después del SRP (116). Padma y col. concluyeron que el uso de 1 ml de HA al 0.2% después del SRP mejoraba los defectos de periodontitis más que solo SRP (50) (117). Otros estudios dicen que el gel de HA al 0.8% mejora los defectos de periodontitis después de 12 semanas de tratamiento con el proceso SRP previo (118)(52). Un ensayo clínico con gel de HA al 0.8% aplicado una vez, y gel de HA al 0.2% aplicado diariamente después de SRP, tras 3 meses, se demostró que los pacientes con geles de HA mejoraban el parámetro de profundidad de sondaje respecto a los pacientes de control (119). Reducir la pérdida de inserción es un proceso esencial en el tratamiento de la periodontitis. Los resultados del presente estudio demuestran que una mayor concentración de hialuronato

(1%) durante 3 meses mejora la CAL y la EP sin diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de prueba.

Este estudio propone un innovadora formulación HA que contiene EGF y un proceso ultrasónico para mejorar la penetración de HA. EGF fue elegido debido a la capacidad de proliferación del periodoncio y potenciador de la diferenciación (68).

HA y EGF se han utilizado para tratar la curación de heridas. Un ensayo clínico realizado por Akane Yu et al. muestra mejoría en la cicatrización de úlceras cutáneas y heridas en epidermis y dermis con una lámina de esponja de hialuronano y EGF (103). Hyemin Kim y col. formularon una película tipo parche, incorporaron HA y EGF, facilitando la administración de EGF en la piel para tratar enfermedades.

Se recopiló y analizó información de pacientes de ambos grupos (Grupo 0 y grupo 1). Los efectos externos de la higiene oral, el estilo de vida saludable y las enfermedades sistémicas en los tratamientos se clasificaron como variables descriptivas. Debido al tamaño y distribución de la población (sin distribución normal), las variables descriptivas no se analizaron estáticamente. La población no fue representativa del análisis de las diferencias estadísticas entre pacientes sanos y no saludables debido a que solo un paciente tenía una enfermedad sistémica relacionada con periodontitis.

Para cada paciente, el número de agujeros negros, la profundidad de sondaje, la medida de la cresta alveolar y la CAL se midieron antes del tratamiento. La mayoría de los pacientes tienen entre 3 y 5 agujeros negros. La media inicial de los agujeros negros en el grupo 0 fue de 3.727 ± 1.4206 y la media del grupo 1 fue de 4.167 ± 1.8504 .

La periodontitis se diagnostica mediante parámetros clínicos como la profundidad de sondaje (PD), la pérdida ósea y la pérdida de inserción clínica (CAL) (2). Estos tres parámetros se analizaron por variación de PD (mm), ACL (mm) y CAL (mm) antes y después de los tratamientos.

PD mide la longitud del agujero negro con una línea de sondaje. PD (mm) la disminución media indica la regeneración periodontal. La PD disminuye después de ambos tratamientos. La distancia (mm) medida con una línea de sondaje desde el punto de contacto interdental hasta el margen gingival disminuyó después de 6 meses de tratamiento. Los pacientes del grupo 1 mejoran la PD con una significación estadística en comparación con el grupo 0 a los tres meses y a los 6 meses ($P = 0,451$ y $0,539$).

Las ACL determinan la longitud del crecimiento de la cresta alveolar. La pérdida ósea es un parámetro clínico de periodontitis (120). En este estudio, se analizaron una emulsión control de HA al 1% y los efectos de una emulsión de HA1%-EGF en la regeneración ósea. La longitud de la cresta alveolar se midió como indicador del crecimiento óseo. Después de 6 meses, la medida de ACL fue más alta que los datos iniciales en ambos tratamientos. Los pacientes del grupo 1 tenían una media de ACL más alta con una significación ($P = 0,33$) en comparación con el grupo 0.

La pérdida de inserción clínica (CAL) es el área de los agujeros negros periodontales. La regeneración del tejido gingival se calcula con la disminución de la CAL. Ambos grupos disminuyen el área de los agujeros negros. La media del tratamiento del grupo 0 es menor que el grupo 1 a los 6 meses con significación. ($P = 0,835$).

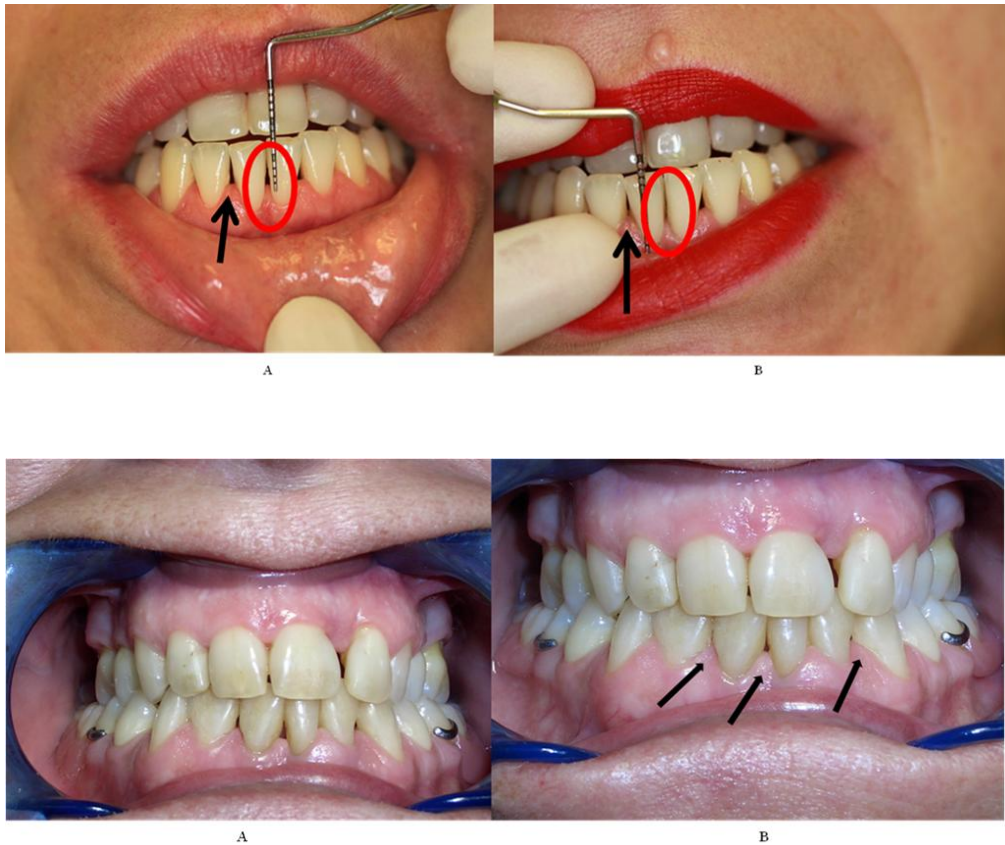


Figura 42. Antes y después de 6 meses de tratamiento (foto de dos pacientes)

6. CONCLUSIONES

El objetivo del trabajo de investigación de la presente Tesis Doctoral ha sido estudiar las propiedades físico-químicas y organolépticas de una serie de formulaciones semisólidas para poder seleccionar la que mejor se adapte para el tratamiento de la periodontitis. Los excipientes y polímeros empleados en su elaboración, van a tener una importancia considerable en muchas de sus propiedades, entre ellas la mucoadhesión, y es por ello que el estudio de la extensibilidad y viscosidad deben ser apropiados puesto que van a influir en la liberación del ingrediente activo, así como en una mayor o menor adhesión a la superficie donde estén destinados a aplicarse. Igualmente el diseño de la formulación incluye la evaluación y el cribado de la estabilidad así como la eficacia de la bioactividad. En base a estas consideraciones, las conclusiones obtenidas en este trabajo son:

1. Respecto al diseño de las formulaciones, se puede concluir que los polímeros incluidos en las mismas, producen una mucoadhesión adecuada debido a su capacidad de cohesión y viscosidad, confiriéndole una extensibilidad favorable a la hora de aplicarlo, siendo de todas las fórmulas analizadas, la EMULSIÓN la que ha demostrado poseer las mejores cualidades tanto organolépticas como físico químicas y microbiológicas para su posterior aplicación.
2. Una formulación estable es fundamental para mantener la efectividad del tratamiento, en este estudio se puede concluir que la emulsión seleccionada cumple con todos los requisitos exigidos a las preparaciones tópicas en cuanto a estabilidad se refiere, obteniendo una caducidad de 5 años.
3. La Emulsión ha resultado ser adecuada desde el punto de vista microbiológico
4. Respecto a los estudios de liberación/permeación podemos concluir que la permeación global de la emulsión aumenta con el tiempo de exposición de la fórmula. Los resultados obtenidos nos indican una mayor penetración cuando se emplea como membrana la piel de pollo, pero probablemente podría ser debido, como se ha comentado a proteína degradada o un falso positivo (proteínas residuales de la mucosa).
5. Es necesario seguir profundizando en el método de valoración de la proteína, la espectrofotometría ultravioleta-visible no se recomienda como ensayo de validación adecuado.
6. Es necesario, en base a lo anterior, el realizar más experimentos para analizar la vida útil y la integridad de EGF tras su paso por diferentes membranas.

7. El ensayo in vitro ha podido permitir evaluar una vida útil efectiva del EGF en la formulación oleosa patentada objeto de estudio de 3 años.
8. Estos datos iniciales nos han servido para seleccionar el preparado EMULSIÓN como el más adecuado para realizar el estudio clínico del efecto que puede producir en defectos periodontales.
9. Los resultados del estudio piloto concluyen que el tratamiento realizado con la emulsión blanco de AH y con la emulsión de HA-EGF en los dos casos, se produce un aumento del tejido gingival y óseo. Se han conseguido resultados positivos en el posible tratamiento de los defectos periodontales.
10. De los ensayos realizados, se ha comprobado que hay mejoras en los tres parámetros clínicos considerados en periodontitis.
11. Podemos concluir que tanto ácido hialurónico como el EGF dan lugar a una mejora de la periodontitis y una disminución en los “black holes”.
12. La aplicación de la formulación estudiada, aplicada in situ con el aparato de electroporación ha resultado ser un elemento innovador y diferencial respecto a los tratamientos hasta la actualidad ya que se trata de un método inocuo y no invasivo, la aplicación del producto mediante el cabezal específico para la zona gingival representa una ventaja para el paciente ya que es indoloro.

CONCLUSIÓN FINAL:

Consideramos que todo el trabajo motivo de esta Tesis Doctoral nos permite poder afirmar que se puede dar salida al mercado del producto desarrollado, ya que ha demostrado su eficacia.

Para ello se procederá a registrar el producto como producto sanitario.

Nombre, tipo de envase, estuche serán elegidos según las propiedades que ha presentado la formulación, que al ser un producto viscoso y considerando el método de aplicación será tipo jeringuilla con aplicador tipo aguja de plástico.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Mu FC. Origen del periodoncio o periodonto. rev.de la Fac odontol USCG. 2018;5:1–7.
2. Dean R. The Periodontal Ligament : Development , Anatomy and Function. J Oral Heal Dent Manag. 2017;16(6):1–7.
3. Cope, Graham & Cope, Anwen. The periodontium: an anatomical guide. Dental Nursing. 7. 376-378. 10.12968/denn.2011.7.7.376. (2011).
4. Gómez de Ferraris E, Campos Muñoz A. Histología y embriología bucodental. J Chem Inf Model. 2009;2:419.
5. I. UM. Anatomy of the periodontium: A biological basis for radiographic evaluation of periradicular pathology. J Dent Oral Hyg. 2014;6(7):70–6.
6. Lindhe J, Wennström JL, Jacobs R, Lindhe J, Karring T. Parte 1 : Anatomía Anatomía de los tejidos periodontales. :2–49.
7. Wilson C, Washington N, Washington C. Physiological Pharmaceutics [Internet]. 2000. Available from: <https://www.taylorfrancis.com/books/9780203483701>
8. Calpena AC, Clares B. pharmacokinetic advances : New formulations of application on the skin and oral mucosa. 2011;661(2).
9. Rodriguez, I. C.; A., Cerezo; Salem I. Sistemas de liberación Bioadhesivos Bioadhesive delivery systems. Ars Pharm. 2000;1(41):115–28.
10. Who COF. Constitution of the World Health Organization. World Health Assembly. Basic Doc. 2006;Supplement (July 1946):1–2.
11. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri - implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. 2018;45(March).
12. Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. J Clin Periodontol. 2018;45(December 2017):S68–77.
13. OMS, O. M. d. I. S. (2007). Salud Bucodental. Nota informativa N°318 OMS.pdf.
14. Holtfreter B, Albandar JM, Dietrich T, Dye BA, Eaton KA, Eke PI, et al. Standards for reporting chronic periodontitis prevalence and severity in

- epidemiologic studies: Proposed standards from the Joint EU/USA Periodontal Epidemiology Working Group. *J Clin Periodontol*. 2015;
15. Tonetti MS, Claffey N. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research: Group C Consensus report of the 5th European workshop in periodontology. *J Clin Periodontol*. 2005;32(SUPPL. 6):210–3.
 16. Paper P: Epidemiology of Periodontal Diseases. *J Periodontol*. 2005;76(8):1406–19. <http://doi.wiley.com/10.1902/jop.2005.76.8.1406>
 17. Fiorellini JP, Howell TH, Cochran D, Malmquist J, Lilly LC, Spagnoli D, et al. Randomized Study Evaluating Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 for Extraction Socket Augmentation. *J Periodontol*. 2005;
 18. Williams RC, Barnett AH, Claffey N, Davis M, Gadsby R, Kellett M, et al. The potential impact of periodontal disease on general health: a consensus view. *Curr Med Res Opin*. 2008; 24(6):1635–43. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1185/03007990802131215>
 19. Chen FM, Zhang J, Zhang M, An Y, Chen F, Wu ZF. A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine. *Biomaterials* 2010;31(31):7892–927. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.019>
 20. Lu H, Xie C, Zhao YM, Chen FM. Translational research and therapeutic applications of stem cell transplantation in periodontal regenerative medicine. *Cell Transplant*. 2013;22(2):205–29.
 21. Mark Bartold P, Van Dyke TE. Periodontitis: A host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. *Periodontol* 2000. 2013;62(1):203–17.
 22. Zaura E, Ten Cate JM. Towards understanding oral health. *Caries Res*. 2015;49(suppl 1):55–61.
 23. Papapanou, P. N. Periodontal Diseases Epidemiology. *Annals of Periodontology* 1996
 24. Lindhe J, Ranney R, Lamster I, Charles A, Chung C-P, Flemmig T, et al. Consensus Report: Chronic Periodontitis. *Ann Periodontol* 1999;4(1):38–38. <http://doi.wiley.com/10.1902/annals.1999.4.1.38>
 25. AAP. Consensus Report: Aggressive Periodontitis. 2012;1. Available from: <papers2://publication/uuid/CD591CB6-5471-4963-AC58-47C4F4D1C7A3>

26. Lindhe J, Ranney R, Lamster I, Charles A, Chung C-P, Flemmig TF, et al. Consensus Report: Necrotizing Periodontal Diseases. *Ann Periodontol.* 1999;4(1):108–108.
<http://www.joponline.org/doi/abs/10.1902/annals.1999.4.1.108%5Cn>
<http://www.joponline.org/doi/abs/10.1902/annals.1999.4.1.18%5Cn>
27. Herrera D, Retamal-Valdes B, Alonso B, Feres M. Acute periodontal lesions (periodontal abscesses and necrotizing periodontal diseases) and endo-periodontal lesions. *J Clin Periodontol.* 2018;45(June 2017):S78–94.
28. Albandar JM, Susin C, Hughes FJ. Manifestations of systemic diseases and conditions that affect the periodontal attachment apparatus: Case definitions and diagnostic considerations. *J Clin Periodontol.* 2018;45:S171–89.
29. Needleman I, Garcia R, Gkranias N, Kirkwood KL, Kocher T, Iorio A Di, et al. Mean annual attachment, bone level, and tooth loss: A systematic review. *J Clin Periodontol.* 2018;45(January 2017):S112–29.
30. Fine DH, Patil AG, Loos BG. Classification and diagnosis of aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2018;45:S95–111.
31. Billings M, Holtfreter B, Papapanou PN, Mitnik GL, Kocher T, Dye BA. Age-dependent distribution of periodontitis in two countries: Findings from NHANES 2009 to 2014 and SHIP-TREND 2008 to 2012. *J Clin Periodontol.* 2018;45:S130–48.
32. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Clin Periodontol.* 2018;45:S149–61.
33. Jepsen S, Caton JG, Albandar JM, Bissada NF, Bouchard P, Cortellini P, et al. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol.* 2018;45:S219–29.
34. Fan J, Caton JG. Occlusal trauma and excessive occlusal forces: Narrative review, case definitions, and diagnostic considerations. *J Clin Periodontol.* 2018;45:S199–206.
35. Ercoli C, Caton JG. Dental prostheses and tooth-related factors. *J Clin Periodontol.* 2018;45 S207–18.

36. Fabrizi S, Barbieri Petrelli G, Vignoletti F, Bascones-Martínez a. Tratamiento quirúrgico vs terapia periodontal básica: estudios longitudinales en periodoncia clínica. *Av en Periodoncia e Implantol Oral*. 2007;19(3):161–75.
37. Becker W, Gabitov I, Stepanov M, Kois J, Smidt A, Becker BE. Minimally invasive treatment for papillae deficiencies in the esthetic zone: A pilot study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2010;12(1):1–8.
38. Yu A, Takeda A, Kumazawa K, Miyoshi H, Kuroyanagi M, Yoshitake T, et al. Preliminary Clinical Study Using a Novel Wound Dressing Composed of Hyaluronic Acid and Collagen Containing EGF. *Open J Regen Med*. 2015;
39. W.J. L, N.S. G. Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: Diagnosis and treatment. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(4):727–52. <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L32979629%0Ahttp://dx.doi.org/10.1128/CMR.14.4.727-752.2001>
40. Engström P-E, Shi X-Q, Tronje G, Larsson A, Welander U, Frithiof L, et al. The Effect of Hyaluronan on Bone and Soft Tissue and Immune Response in Wound Healing. *J Periodontol*. 2001;
41. Pilloni A, Annibali S, Dominici F, Di Paolo C, Papa M, Cassini MA, et al. Evaluation of the efficacy of an hyaluronic acid-based biogel on periodontal clinical parameters. A randomized-controlled clinical pilot study. *Ann Stomatol (Roma)*. 2011;
42. Akram Z. How effective is adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in treating deep periodontal pockets in periodontal disease? A systematic review. *J Investig Clin Dent*. 2018;9(4):e12345.
43. Cortellini P. Reconstructive periodontal surgery: A challenge for modern periodontology. *Int Dent J*. 2006;56:250–5.
44. McCulloch Cag. Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. *Periodontol 2000*. 1993;1(1):16–25.
45. Trombelli L, Farina R. Clinical outcomes with bioactive agents alone or in combination with grafting or guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol*. 2008;35(SUPPL. 8):117–35.
46. Fallacara A, Baldini E, Manfredini S, Vertuani S. Hyaluronic acid in the third millennium. *Polymers*. 2018.
47. Bartold PM, Wiebkin OW, Thonard JC. Glycosaminoglycans of human gingival

- epithelium and connective tissue. Vol. 9, Connective Tissue Research. 1981. p. 99–106.
48. Giannobile W V, Riviere GR, Gorski JP, Tira DE, Cobb CM. Glycosaminoglycans and periodontal disease: analysis of GCF by safranin O. Vol. 64, The Journal of periodontology. 1993p.186–90. <http://www.joponline.org/doi/abs/10.1902/jop.1993.64.3.186>
 49. Ialenti A, Di Rosa M. Hyaluronic acid modulates acute and chronic inflammation. Agents Actions. 1994;43(1-2):44–7.
 50. Eick S, Renatus A, Heinicke M, Pfister W, Stratul S-I, Jentsch H. Hyaluronic Acid as an Adjunct After Scaling and Root Planing: A Prospective Randomized Clinical Trial. J Periodontol. 2013;84(7):941–9.
 51. Gontiya G, Galgali S. Effect of hyaluronan on periodontitis: A clinical and histological study. Vol. 16, Journal of Indian Society of Periodontology. 2012. p. 184: <http://www.jisponline.com/text.asp?2012/16/2/184/99260>
 52. Johannsen G. Local Delivery of Hyaluronan as an Adjunct to Scaling and Root Planing in the Treatment of Chronic Periodontitis. 2009;(September):1493–7.
 53. Pilloni A, Schmidlin PR, Sahrman P, Sculean A, Rojas MA. Correction to: Effectiveness of adjunctive hyaluronic acid application in coronally advanced flap in Miller class I single gingival recession sites: a randomized controlled clinical trial (Clinical Oral Investigations, (2018), 10.1007/s00784-018-2537-4). Clinical Oral Investigations. 2018.
 54. Knopf-Marques H, Pravda M, Wolfova L, Velebny V, Schaaf P, Vrana NE, et al. Hyaluronic Acid and Its Derivatives in Coating and Delivery Systems: Applications in Tissue Engineering, Regenerative Medicine and Immunomodulation. Adv Healthc Mater. 2016;5(22):2841–55.
 55. Maharjan AS, Pilling D, Gomer RH. High and Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Differentially Regulate Human Fibrocyte Differentiation. 2011;6(10).
 56. Brown MB, Hanpanitcharoen M, Martin GP. An in vitro investigation into the effect of glycosaminoglycans on the skin partitioning and deposition of NSAIDs. Int J Pharm. 2001;225(1–2):113–21.
 57. Stern R, Kogan G, Jedrzejewski MJ, Šoltés L. The many ways to cleave hyaluronan. Biotechnol Adv. 2007,Nov1;25(6):537–57.

58. Olczyk P, Mencner Ł, Komosinska-Vassev K. The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. *Biomed Res Int.* 2014;2014:124.
59. Cohen S. Origins of growth factors: NGF and EGF. *J Biol Chem.* 2008;283(49):33793–7.
60. Martínez-Carpio PA, Navarro Moreno MA. Factores de crecimiento, lesión celular, proteincinasas dependientes de ciclinas y sus inhibidores: su relevancia en la patología molecular del cáncer humano. *Med Clin (Barc)* 2003 Jan 1;120(7):265 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025775303736732>
61. Santana H, González Y, Campana PT, Noda J, Amarantes O, Itri R, et al. Screening for stability and compatibility conditions of recombinant human epidermal growth factor for parenteral formulation: Effect of pH, buffers, and excipients. *Int J Pharm.* 2013;
62. Fransson J, Hammar H. Epidermal Growth. *Int J Dermatol.* 1988;27(5):281–90.
63. Edwin F, Wiepz GJ, Singh R, Peet CR, Chaturvedi D, Bertics PJ, et al. A historical perspective of the EGF receptor and related systems. *Methods Mol Biol.* 2006;327(1):1–24.
64. Erbst Roysh. Review Of Epidermal Growth Factor Receptor Biology. 2004;59(2):21–6.
65. Lu HS, Chai JJ, Li M, Huang BR, He CH, Bi RC. Crystal structure of human epidermal growth factor and its dimerization. *J Biol Chem.* 2001;276(37):34913–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11438527>
66. Taylor J; iitchell WA, Cohes S. Epidermal Growth Factor Physical, Asd Chemical Properties*. Vol. 247. 1972. <http://www.jbc.org/>
67. Khanbanha N, Atyabi F, Taheri A, Talaie F, Mahbod M, Dinarvand R. Healing Efficacy of an EGF Impregnated Triple Gel Based Wound Dressing : In Vitro and In Vivo Studies. 2014;2014.
68. Parkar MH, Kuru L, Giouzeli M, Olsen I. Expression of growth-factor receptors in normal and regenerating human periodontal cells. *Arch Oral Biol.* 2001;46(3):275–84.
69. Angel-mosqueda C Del, Gutiérrez-puente Y, López-lozano AP, Romero-zavaleta RE, Mendiola-jiménez A, Eduardo C, et al. Epidermal growth factor enhances osteogenic differentiation of dental pulp stem cells in vitro. *Head Face Med.*

- 2015;1–9. <http://dx.doi.org/10.1186/s13005-015-0086-5>
70. ART_2001_Expression of growth-factor receptors in normal and regenerating human periodontal cells.
 71. Botero JE, Bedoya E. Determinantes del Diagnóstico Periodontal. *Rev Clínica Periodoncia, Implantol y Rehabil Oral* [2010;3(2):94–9.: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0718539110700495>
 72. Aw J, Scholz GM, Huq NL, Huynh J, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC. Interplay between *Porphyromonas gingivalis* and EGF signalling in the regulation of CXCL14. *Cell Microbiol.* 2018;20:e12837.
 73. Del Angel-Mosqueda C, Gutiérrez-Puente Y, López-Lozano AP, Romero-Zavaleta RE, Mendiola-Jiménez A, Medina-De la Garza CE, et al. Epidermal growth factor enhances osteogenic differentiation of dental pulp stem cells in vitro. *Head Face Med.* 2015;
 74. Darveau RP. Periodontitis : a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Publ Gr.* 2010;8(7):481–90. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2337>
 75. Aw J, Scholz GM, Huq NL, Huynh J, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC. Interplay between *Porphyromonas gingivalis* and EGF signalling in the regulation of CXCL14. *Cell Microbiol.* 2018;20(7):1–13.
 76. Teramatsu Y, Maeda H, Sugii H, Tomokiyo A, Hamano S, Wada N, et al. Expression and effects of epidermal growth factor on human periodontal ligament cells. *Cell Tissue Res.* 2014;357(3):633–43.
 77. Fiorellini JP, Howell TH, Cochran D, Malmquist J, Lilly LC, Spagnoli D, et al. Randomized Study Evaluating Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 for Extraction Socket Augmentation. *J Periodontol.* 2005;76(4):605–13.: <http://www.joponline.org/doi/10.1902/jop.2005.76.4.605>
 78. Darveau RP. Periodontitis: A polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(7):481.
 79. Pyrc K, Milewska A, Kantyka T, Sroka A, Maresz K, Koziel J, et al. Inactivation of epidermal growth factor by *Porphyromonas gingivalis* as a potential mechanism for periodontal tissue damage. *Infect Immun.* 2013;
 80. Choi SO, Kim YC, Lee JW, Park JH, Prausnitz MR, Allen MG. Intracellular protein delivery and gene transfection by electroporation using a microneedle electrode array. *Small.* 2012;8(7):1081–91.

81. Carvajal-Vidal P, Mallandrich M, García ML, Calpena AC. Effect of different skin penetration promoters in halobetasol propionate permeation and retention in human skin. *Int J Mol Sci.* 2017;18(11).
82. Dreno B, Araviiskaia E, Berardesca E, Bieber T, Hawk J, Sanchez-Viera M, et al. The science of dermocosmetics and its role in dermatology. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2014;28(11):1409–17.
83. Fonseca-Santos B, Chorilli M. An overview of polymeric dosage forms in buccal drug delivery: State of art, design of formulations and their in vivo performance evaluation. *Mater Sci Eng C.* 2018;86(September 2017):129–43. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.12.022>
84. Szulc M, Zakrzewska A, Zborowski J. Local drug delivery in periodontitis treatment: A review of contemporary literature. *Dent Med Probl.* 2018;
85. Cook SL, Bull SP, Methven L, Parker JK, Khutoryanskiy V V. Mucoadhesion: A food perspective. *Food Hydrocoll.* 2017 Nov 1 ;72:281–96. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X16310591>
86. Khutoryanskiy V V. Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers. *Macromol Biosci.* 2011;11(6):748–64.
87. Manohar SD, Sridhar DA, Mallikarjuna SC. Drug delivery from the oral cavity: A focus on mucoadhesive buccal drug delivery systems. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2012;66(5):466–500.
88. Gandhi RB, Robinson JR. Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery. Vol. 13, *Advanced Drug Delivery Reviews.* 1994.
89. Rathbone MJ, Pather I, Şenel S. *Oral Mucosal Drug Delivery and Therapy.* 2015; <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4899-7558-4>
90. Roy S, Pal K, Anis A, Pramanik K, Prabhakar B. Polymers in mucoadhesive drug-delivery systems: A brief note. *Des Monomers Polym.* 2009;12(6):483–95.
91. Carvalho FC, Bruschi ML, Evangelista RC, Gremião MPD. Mucoadhesive drug delivery systems. *Brazilian J Pharm Sci.* 2010;46(1):1–17.
92. Sanired. ES 2 502 691 B1: Método de conservación y estabilización de proteínas, aplicable para desarrollos industriales de formulaciones de productos sanitarios, farmacéuticos y cosméticos. N° Solicitud 201331394 N° Publicación ES2502691. España; 2015.
93. Salamanca CH, Barrera-Ocampo A, Lasso JC, Camacho N, Yarce CJ. Franz

- diffusion cell approach for pre-formulation characterisation of ketoprofen semi-solid dosage forms. *Pharmaceutics*. 2018;10(3):1–10.
94. González CG, Angulo AR, Quezada MN, Plúas GE. Detección Espectrofotométrica y Cuantificación de Ácido Salicílico en Fármacos. 2018
 95. Bertl K, Bruckmann C, P-e I, Klinge B, Gotfredsen K, Stavropoulos A. Hyaluronan in non-surgical and surgical periodontal therapy: a systematic review. 2015;(Sutherland 1998).
 96. Fujioka-kobayashi M, Müller H, Mueller A, Lussi A, Sculean A, Schmidlin PR, et al. In vitro effects of hyaluronic acid on human periodontal ligament cells. *BMC Oral Health* . 2017;1–12.: <http://dx.doi.org/10.1186/s12903-017-0341-1>
 97. Bevilacqua L, Eriani J, Serroni I, Liani G, Borelli V, Castronovo G, et al. Effectiveness of adjunctive subgingival administration of amino acids and sodium hyaluronate gel on clinical and immunological parameters in the treatment of chronic periodontitis Original article. Vol. III, *Annali di Stomatologia*. 2012.
 98. Fallacara A, Baldini E, Manfredini S, Vertuani S. Hyaluronic acid in the third millennium. *Polymers (Basel)*. 2018;10(7):701.
 99. Casale M, Moffa A, Vella P, Sabatino L, Capuano F, Salvinelli B, et al. Hyaluronic acid: Perspectives in dentistry. A systematic review. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2016.
 100. Kim IL, Mauck RL, Burdick JA. Hydrogel design for cartilage tissue engineering: A case study with hyaluronic acid. *Biomaterials*. 2011;
 101. Fawzy El-Sayed KM, Dahaba MA, Aboul-Ela S, Darhous MS. Local application of hyaluronan gel in conjunction with periodontal surgery: A randomized controlled trial. *Clin Oral Investig*. 2012;
 102. Mani A, Pawar B, Pendyala G, Mustilwar R, Bhosale A, Bhadange S. Hyaluronic acid - A boon to periodontal therapy. *Pravara Medical Review*. 2016.
 103. Kim H, Kong WH, Seong KY, Sung DK, Jeong H, Kim JK, et al. Hyaluronate - Epidermal Growth Factor Conjugate for Skin Wound Healing and Regeneration. *Biomacromolecules*. 2016;17(11):3694–705.
 104. Causa E, Vila H. EGF: Innovación y Seguridad https://co.fagron.com/sites/default/files/epifactor_abril_2014_0.pdf
 105. Simmons PA, Vehige JG. Investigating the potential benefits of a new artificial

- tear formulation combining two polymers. *Clin Ophthalmol*. 2017;11:1637–42.
106. Maeng JH, Bang BW, Lee E, Kim J, Kim HG, Lee DH, et al. Endoscopic application of EGF-chitosan hydrogel for precipitated healing of GI peptic ulcers and mucosectomy-induced ulcers. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25(2):573–82.
 107. Schiffter HA. *Pharmaceutical Proteins - Structure, Stability, and Formulation*. Second Edi. Vol. 5, *Comprehensive Biotechnology*, Second Edition. Elsevier B.V.; 2011. 521–541 p. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00468-2>
 108. Verhulst C, Coiffard C, Coiffard LJM, Rivalland P, De Roeck-Holtzhauer Y. In vitro correlation between two colorimetric assays and the pyruvic acid consumption by fibroblasts cultured to determine the sodium laurylsulfate cytotoxicity. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1998;39(3):143–6.
 109. Saunders JB, Aasland OG, Babor TF, De La Fuente JR, Grant M. Development of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): WHO Collaborative Project on Early Detection of Persons with Harmful Alcohol Consumption-II. *Addiction* 993;88(6):791–804.<https://doi.org/10.1111/j.13600443.1993.tb02093.x>
 110. Parente ME, Ochoa Andrade A, Ares G, Russo F, Jiménez-Kairuz A. Bioadhesive hydrogels for cosmetic applications. *Int J Cosmet Sci*. 2015;37(5):511–8.
 111. Crow J., Beckman JS. Quantitation of Protein Tyrosine, 3-Nitrotyrosine, and 3-Aminotyrosine Utilizing HPLC and Intrinsic Ultraviolet Absorbance. *Methods*. 1995;7(1):116–20.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202385710171>
 112. Brady PN, Macnaughtan MA. Evaluation of colorimetric assays for analyzing reductively methylated proteins: Biases and mechanistic insights. *Anal Biochem*. 2015 Dec 15;491:43–51
 113. Lu HS, Chai JJ, Li M, Huang BR, He CH, Bi RC. Crystal structure of human epidermal growth factor and its dimerization. *J Biol Chem*. 2001 Sep 14 ;276(37):34913–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11438527>
 114. Schmid F-X. *Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry*.
 115. Pilloni A, Annibali S, Dominici F, Di Paolo C, Papa M, Cassini MA, et al. Evaluation of the efficacy of an hyaluronic acid-based biogel on periodontal clinical parameters. A randomized-controlled clinical pilot study. *Ann Stomatol (Roma)*. 2011;2(3-4):3.

116. Xu Y, Höfling K, Fimmers R, Frentzen M, Jervøe-Storm PM. Clinical and Microbiological Effects of Topical Subgingival Application of Hyaluronic Acid Gel Adjunctive to Scaling and Root Planing in the Treatment of Chronic Periodontitis. *J Periodontol.* 2004;
117. Randomized PA, Trail C, Rajan P, Baramappa R, Rao NM. Hyaluronic Acid as an Adjunct to Scaling and Root Planing in Chronic. 2014;11–4.
118. Al-Shammari NM, Shafshak SM, Ali MS. Effect of 0.8% hyaluronic acid in conventional treatment of moderate to severe chronic periodontitis. *J Contemp Dent Pract.* 2018;19(5):527–34.
119. Eick S, Renatus A, Heinicke M, Pfister W, Stratul S-I, Jentsch H. Hyaluronic Acid as an Adjunct After Scaling and Root Planing: A Prospective Randomized Clinical Trial. *J Periodontol.* 2013;84(7):941–9.
120. Susin C, Hughes FJ. Manifestations of systemic diseases and conditions that affect the periodontal attachment apparatus : Case definitions. 2018;89(July 2016):183–203.

8. ANEXOS

ANEXO 1 Hoja consentimiento informado

ANEXO 2 Hoja información al paciente

ANEXO 3 Hoja cuestionario recogida de datos

ANEXO 4 Tablas estadísticas

ANEXO 5 Comité ético



ANEXO 1

Hoja consentimiento informado

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO ESTUDIO “EFICACIA DEL ÁCIDO HIALURÓNICO Y FACTORES DE CRECIMIENTO APLICADO POR ELECTROPORACIÓN EN DEFECTOS GINGIVALES”

De conformidad con lo dispuesto en la legislación vigente:

- x Ley 14/1986, de 25 de abril, General de Sanidad
- x Ley 2/1998, de 15 de junio, de Salud de Andalucía. (BOJA núm.74 de 4 de julio de 1998)
- x Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica. (BOE núm.274 de 15 de noviembre de 2002).

Yo D./Dña.: _____ con DNI _____

y mayor de edad, certifico que:

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.
- Comprendo que mi participación es voluntaria y presto libremente mi conformidad.
- Comprendo que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones, sin que esto repercuta a mis cuidados médicos.
- He hablado con el odontólogo investigador _____

Por estos hechos: SI NO

--- Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

--- Accedo a que, para documentar mi participación, se recopilen datos, se realicen mediciones y se tomen imágenes como fotos y videos. También podrán utilizarse para la difusión del conocimiento científico siempre y cuando mi identidad sea preservada de forma confidencial de acuerdo a las leyes de protección de datos:

Datos del paciente:

Dirección: _____ CP: _____

Teléfono: _____ Correo electrónico: _____

FIRMA DEL PACIENTE

FIRMA Y DNI DEL INVESTIGADOR

FECHA: ____/____/____

FECHA: ____/____/____



ANEXO 2

Hoja de Información al Paciente

TÍTULO DEL ESTUDIO:

EFICACIA DEL ÁCIDO HIALURÓNICO Y FACTORES DE CRECIMIENTO APLICADO POR ELECTROPORACIÓN EN DEFECTOS GINGIVALES

PROMOTOR DEL ENSAYO:

Instituto de Investigación Biotecnológica, Farmacéutica y de Medicamentos Huérfanos
S.L. Avda. del Conocimiento nº3. Parque Tecnológico de la Salud de Granada. Edif. CDFA.
CP: 18100 Armilla (Granada).

NOMBRE Y DIRECCIÓN DE ENTIDADES DE ENSAYO

-- Dra. Elena Sánchez Fernández. Profesora Titular de Cirugía Bucal . Facultad de Odontología de la Universidad de Granada

-- Instituto de Investigación Biotecnológica, Farmacéutica y de Medicamentos Huérfanos
S.L. Avda. del Conocimiento nº3. Parque Tecnológico de la Salud de Granada. Edif. CDFA.
CP: 18100 Armilla (Granada).

INTRODUCCION

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido elaborado, de acuerdo a la legislación vigente, el Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos.

Nuestra intención es que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja

informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento. Para participar en el estudio se deberán de cumplir una serie de requisitos previos que se enumeran a continuación:

- Ausencia de alergias conocidas a productos cosméticos o a los componentes de la formulación.
- Ausencia de marcapasos.

Asimismo el día de la aplicación del cosmético se deberán cumplir las siguientes necesidades:

- No tomar ningún tratamiento anti-alérgico o anti-inflamatorio el día del estudio y varias horas tras la aplicación para que en el caso de la aparición de reacciones alérgicas, éstas no se vean enmascaradas por estos fármacos (en caso de necesidad terapéutica: salida del estudio).
- No llevar puestos metales (*piercings*, pendientes, joyas, etc.) en ninguna parte del cuerpo (visible o no visible) el día de la aplicación puesto que podrían calentarse por efecto de la máquina utilizada en la aplicación.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

El objetivo principal del estudio es el de evaluar la eficacia de una formulación compuesta por ácido hialurónico y factores de crecimiento aplicada mediante una máquina de electroporación.

La zona en la que se realizará la aplicación y en la que se realizarán mediciones de eficacia es las ENCIAS

Los procesos de recopilación de datos personales, de aplicación del cosmético y de mediciones de la eficacia se realizarán siempre por parte de personal sanitario debidamente cualificado.

Los datos obtenidos durante las mediciones, las fotos tomadas durante las evaluaciones, así como los datos personales de los voluntarios, serán tratados siempre bajo las normas de confidencialidad y las leyes de protección de datos.

No se conocen casos en los que las mediciones realizadas con los aparatos de eficacia así como la aplicación del producto con nuestra máquina hayan producido algún daño o perjuicio a los voluntarios. El proceso de aplicación de la formulación seguirá el siguiente proceso:

Se pondrá la máquina en posición de electroporación y se aplicará el producto sobre la encía a tratar mediante un leve masaje con el terminal apropiado insertado en la máquina. Normalmente la aplicación no produce ninguna molestia y dura unos 10 minutos hasta la total absorción de toda la formulación.

Tras la aplicación se volverán a tomar fotografías y a realizar mediciones en las zonas tratadas.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Gracias a este estudio, queremos conseguir demostrar que la administración de HA solo o junto a factores de crecimiento en los defectos gingivales podría lograr beneficios comparables con los resultados quirúrgicos tras el uso de injertos; y de esta forma evitar intervenciones a los pacientes que presentan este tipo de alteraciones estéticas y funcionales.

Por otro lado, con el uso de la máquina de electroporación conseguiremos que haya una rápida absorción de los activos en la superficie gingival del voluntario, de manera que se facilite de manera rápida la disminución y/o eliminación de triángulos negros en los espacios interdentarios. Pese a todos estos beneficios, puesto que estamos probando un producto en desarrollo, es posible que los voluntarios del estudio obtengan menores beneficios de los esperados.

En principio, la administración de los productos mediante las máquinas de estudio, así como la realización de las mediciones y las pruebas normales no producirán ningún

acontecimiento adverso a los sujetos voluntarios. Pueden darse casos de ligera sequedad.

En condiciones normales el producto aplicado no debería de producir ninguna reacción adversa, pero en el caso de la aparición de afecciones o alergias al producto deberá de notificarse a Inves Biofarm mediante el teléfono 958 071 719 y al profesional sanitario participante en el estudio, en este caso a la Dra. Elena Sánchez (teléfono: 958 267 066), para que revise los posibles efectos adversos y en el caso necesario prescriba un tratamiento adecuado.

SEGURO

El Promotor del estudio dispone de una póliza de seguros que se ajustará a la legislación vigente y que le proporcionará la compensación e indemnización en caso de menoscabo de su salud o de lesiones que pudieran producirse en relación con su participación en el estudio.

CONFIDENCIALIDAD

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse al responsable del estudio.

Los datos personales, mediciones y fotos recogidas durante el estudio estarán identificados mediante un código específico para cada voluntario para salvaguardar así su identidad y solo los integrantes y colaboradores del estudio podrán relacionar dichos datos con usted. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones (bajo previa solicitud al interesado) o en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad. Los datos también podrán utilizarse para la difusión del conocimiento científico siempre y cuando la identidad de los voluntarios sea preservada de forma confidencial. El acceso a su información personal quedará restringido los colaboradores del estudio, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), y al personal autorizado por el promotor.

ASPECTOS ECONÓMICOS

El promotor del estudio es el responsable de gestionar la financiación del mismo. Su participación en el estudio no le supondrá ningún gasto.

OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE

Debe saber que puede ser excluido del estudio si el promotor o los investigadores del estudio lo consideran oportuno, o porque se considere que no se está cumpliendo con los procedimientos establecidos. En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo que ha ocasionado su retirada del estudio.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

Cuando acabe su participación es posible que no se le pueda seguir administrando la formulación del estudio. Por lo tanto, ni el investigador ni el promotor adquieren compromiso alguno de mantener dicho tratamiento fuera de este estudio.

DATOS DE CONTACTO

Datos del Investigador Principal: ELENA SÁNCHEZ

FERNÁNDEZ Teléfono de contacto: 958 267 066

Correo electrónico: e-mail: elenasf@ugr.es



ANEXO 3

EFICACIA DEL ÁCIDO HIALURÓNICO Y FACTORES DE CRECIMIENTO APLICADO POR ELECTROPORACIÓN EN DEFECTOS GINGIVALES

FECHA		Nº PACIENTE	
-------	--	-------------	--

FICHA DE RECOGIDA DE DATOS

APELLIDOS	
NOMBRE	
EDAD	
SEXO	<input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Femenino

PACIENTE GRUPO: (BOLAS)

AZUL (Fórmula 1)

ROJA (Fórmula 2)

1. **¿Fumador?** En caso afirmativo, indique con qué frecuencia:

NO

Sí: ≤ de 10 cigarrillos

Sí: > de 10 cigarrillos

2. **Alcohol**

NO

Sí: más de 3 vasos/día

3. **Higiene bucal**

Buena

Regular

Mala

- Frecuencia de cepillado:

1 vez/día

2 veces/día

3 veces/día

- ¿Usa enjuague bucal? En caso afirmativo indique nombre comercial:

NO

Sí _____

- ¿Usa seda/hilo dental?

NO

Sí

4. ¿Bruxista?

NO

Sí

5. ¿Apretador?

NO

Sí

6. Enfermedades actuales

- Diabetes. En caso afirmativo indicar tipo:

NO

Sí _____

- Hipertensión

NO

Sí

- Osteoporosis. En caso afirmativo indicar tratamiento:

NO

SÍ

estrógenos

calcio

bisfosfonatos

vitamina D

calcitonina

antirresortivos

- Otros. En caso afirmativo indicar nombre

NO

SÍ _____

7. Espacios interdentarios: DISTANCIA PUNTO DE CONTACTO INTERDENTARIO - PAPILA (DPC-P)

(Código): ej: IC-IL-SD

ENTRE INCISIVOS CENTRALES (IC-IC)	SUPERIOR <input type="checkbox"/>		INFERIOR <input type="checkbox"/>	
INCISIVO CENTRAL- INCISIVO LATERAL (IC- IL)	SUPERIOR		INFERIOR	
	derecho <input type="checkbox"/>	Izquierdo <input type="checkbox"/>	derecho <input type="checkbox"/>	Izquierdo <input type="checkbox"/>
INCISIVO LATERAL- CANINO (IL-CA)	SUPERIOR		INFERIOR	
	derecho <input type="checkbox"/>	Izquierdo <input type="checkbox"/>	derecho <input type="checkbox"/>	Izquierdo <input type="checkbox"/>
CANINO-PREMOLAR 1 (CA-PR)	SUPERIOR		INFERIOR	
	derecho <input type="checkbox"/>	Izquierdo <input type="checkbox"/>	derecho <input type="checkbox"/>	Izquierdo <input type="checkbox"/>

DPC-P: Inicio: ____ mm 3 meses: ____ mm 6 meses: ____ mm

ENTRE INCISIVOS CENTRALES (IC-IC)	SUPERIOR <input type="checkbox"/>		INFERIOR <input type="checkbox"/>	
INCISIVO CENTRAL- INCISIVO LATERAL (IC- IL)	SUPERIOR		INFERIOR	
	derecho <input type="checkbox"/>	Izquierdo <input type="checkbox"/>	derecho <input type="checkbox"/>	Izquierdo <input type="checkbox"/>
INCISIVO LATERAL- CANINO (IL-CA)	SUPERIOR		INFERIOR	
	derecho <input type="checkbox"/>	Izquierdo <input type="checkbox"/>	derecho <input type="checkbox"/>	Izquierdo <input type="checkbox"/>
CANINO-PREMOLAR 1 (CA-PR)	SUPERIOR		INFERIOR	
	derecho <input type="checkbox"/>	Izquierdo <input type="checkbox"/>	derecho <input type="checkbox"/>	Izquierdo <input type="checkbox"/>

DPC-P: Inicio: ____ mm 3 meses: ____ mm 6 meses: ____ mm

8. Nivel de cresta ósea mediante Radiografía Digital (mediciones con el Programa Dent-A-View):

Altura cresta ósea en mm (desde cuello dentario hasta el nivel óseo crestal):

Código del espacio: _____

Inicial (1ª Visita):

6 meses:

MESIAL ____ mm

MESIAL ____ mm

MESIAL ____ mm

DISTAL ____ mm

DISTAL ____ mm

DISTAL ____ mm

9. Periodontograma: inicio, 6 meses

Hojas Anexas.

10. Fotografías:

1ª sesión: Fecha:

3 meses: Fecha:

6 meses: Fecha:

ANOTACIONES:

- 1ª consulta (registros clínicos, Rx y fotos + aplicación 1ª sesión): _____
- Sesión 2 (aplicación 2ª semana): _____
- Sesión 3: (aplicación 3ª semana): _____
- Sesión 4: (aplicación 4ª semana) : _____
- Sesión 5 : (aplicación 6ª semana/ mes y medio): _____
- Sesión 6: (aplicación 8ª semana/2 meses): _____
- Sesión 7: (aplicación 10ª semana/2 meses y medio): _____
- Sesión 8: (aplicación 12ª semana/ 3 meses): Registros clínicos y fotos:

- Sesión 9: (aplicación 4 meses): _____
- Sesión 10: (aplicación 5 meses): _____

Sesión 11: (revisión 6 meses): Registros clínicos, Rx y fotos: _____

ANEXO 4

TABLAS RESULTADOS ESTADÍSTICO

En primero lugar se presenta un breve resumen de las variables poblacionales. Se presentan los porcentajes de las modalidades de cada variable.

GRUPO

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido 0	11	47,8	47,8	47,8
1,0	12	52,2	52,2	100,0
Total	23	100,0	100,0	

SEXO

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido masculino	4	17,4	17,4	17,4
femenino	19	82,6	82,6	100,0
Total	23	100,0	100,0	

FUMADOR

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido no	16	69,6	69,6	69,6
si	3	13,0	13,0	82,6
ocasio nal	4	17,4	17,4	100,0
Total	23	100,0	100,0	

ALCOHOL

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido no	22	95,7	95,7	95,7
ocasional	1	4,3	4,3	100,0
Total	23	100,0	100,0	

HIGIENE BUCAL

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido no	19	82,6	82,6	82,6
si	4	17,4	17,4	100,0
Total	23	100,0	100,0	

FRECUENCIA CEPILLADO

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido 1 vez día	1	4,3	4,3	4,3
2 veces día	5	21,7	21,7	26,1
3 veces día	17	73,9	73,9	100,0
Total	23	100,0	100,0	

ENJUAGUE BUCAL

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido no	19	82,6	82,6	82,6
si	4	17,4	17,4	100,0
Total	23	100,0	100,0	

HILO DENTAL

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido no	4	17,4	17,4	17,4
si	19	82,6	82,6	100,0
Total	23	100,0	100,0	

BRUXISTA

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido no	15	65,2	65,2	65,2
si	8	34,8	34,8	100,0
Total	23	100,0	100,0	

APRETADOR

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido no	13	56,5	56,5	56,5
si	10	43,5	43,5	100,0
Total	23	100,0	100,0	

DIABETES

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido no	23	100,0	100,0	100,0

HIPERTENSIÓN

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido no	23	100,0	100,0	100,0

OSTEOPOROSIS

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido no	22	95,7	95,7	95,7
si	1	4,3	4,3	100,0
Total	23	100,0	100,0	

OTRAS ENFERMEDADES

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido Ninguna	20	87,0	87,0	87,0
ARTROSIS	1	4,3	4,3	91,3
ESCLEROSIS	1	4,3	4,3	95,7
MULTIPLE	1	4,3	4,3	100,0
HIPOTIROIDISMO	1	4,3	4,3	100,0
Total	23	100,0	100,0	

ESPACIOS (BLACK HOLES)

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido 1,0	1	4,3	4,3	4,3
2,0	2	8,7	8,7	13,0
3,0	8	34,8	34,8	47,8
4,0	4	17,4	17,4	65,2
5,0	5	21,7	21,7	87,0
6,0	1	4,3	4,3	91,3
7,0	1	4,3	4,3	95,7
8,0	1	4,3	4,3	100,0
Total	23	100,0	100,0	

Las variables propiamente del estudio son Clínica, Rayos X y Foto. La variable Rx solo se presenta al comienzo y al final del estudio y no en el periodo intermedio.

Metodología Estadística: Vamos a realizar comparaciones entre el momento inicial del estudio; los resultados a los tres meses y a los 6 meses. Para ellos se realizan un estudio de diferencia de medias para muestras apareadas. Dado el tamaño de la población y el que las muestras no se distribuyen según una normal se realizan contrastes no paramétricos.

Variable Clínica:

Si obtenemos los resultados estadísticos descriptivos de las variables clínica obtenemos que hay una reducción en la media entre los datos de la variable Clínica inicial y Clínica a los 6 meses.

Estadísticas de muestras emparejadas

	Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Par 1 clínica 0	2,3764	89	1,16111	,12308
clínica 3	1,76966292	89	1,148259997	,121715316
Par 2 clínica 0	2,3667	90	1,15826	,12209
clínica 6	1,522222222	90	1,146345221	,120835396

También podemos ver como existen frecuencias más bajas conforme aumenta el tiempo. Observamos como conforme el estudio va avanzando hay una reducción de los espacios

clínica 0

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	1,00	2	8,7	8,7	8,7
	1,50	7	30,4	30,4	39,1
	2,00	8	34,8	34,8	73,9
	2,50	1	4,3	4,3	78,3
	3,00	3	13,0	13,0	91,3
	5,00	1	4,3	4,3	95,7
	9,00	1	4,3	4,3	100,0
	Total	23	100,0	100,0	

clínica 3

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	0,500000	2	8,7	9,1	9,1
	1,000000	12	52,2	54,5	63,6
	1,500000	2	8,7	9,1	72,7
	2,000000	2	8,7	9,1	81,8
	3,000000	2	8,7	9,1	90,9
	4,000000	1	4,3	4,5	95,5
	8,000000	1	4,3	4,5	100,0
	Total	22	95,7	100,0	
Perdidos	Sistema	1	4,3		
Total		23	100,0		

clínica 6

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	,000000	2	8,7	9,1	9,1
	,500000	3	13,0	13,6	22,7
	1,000000	9	39,1	40,9	63,6
	1,500000	2	8,7	9,1	72,7
	2,000000	2	8,7	9,1	81,8
	2,500000	1	4,3	4,5	86,4
	3,000000	2	8,7	9,1	95,5
	8,000000	1	4,3	4,5	100,0
	Total	22	95,7	100,0	
Perdidos	Sistema	1	4,3		
Total		23	100,0		

A continuación contrastaremos, de forma no paramétrica si esta reducción de la variable Clínica es estadísticamente significativa. Obteniendo que existe diferencias significativas en la reducción de la variable Clínica ya desde los 6 meses

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La mediana de las diferencias entre rangos con clínica 0 y clínica 3 es igual a 0.	Prueba de Wilcoxon de los signos para muestras relacionadas	,000	Rechace la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La mediana de las diferencias entre rangos con clínica 0 y clínica 6 es igual a 0.	Prueba de Wilcoxon de los signo para muestras relacionadas	,000	Rechace la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

Y también entre los 3 y los 6 meses

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La mediana de las diferencias entre rangos con clínica 6 y clínica 3 es igual a 0.	Prueba de Wilcoxon de los signo para muestras relacionadas	,000	Rechace la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

Una vez contrastado que efectivamente hay diferencias significativas en el estudio a los 6 meses, pasaremos a intentar comprobar si existen diferencias significativas entre el Grupo de estudio (Grupo 0) y el Grupo de Control (Grupo 1), resultando que no existen diferencias estadísticamente hablando entre los resultados obtenidos por el grupo de control y el otro grupo.

Estadísticas de grupo

	GRUPO	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
clinica3clinica0	0	38	-,5526	,41573	,06744
	1,0	51	-,6471	,59409	,08319
clinica6clinica0	0	39	-,7949	,46901	,07510
	1,0	51	-,8824	,77193	,10809
clinica6clinica3	0	38	-,2500	,38114	,06183
	1,0	51	-,2353	,39183	,05487

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de clinica3clinica0 es la misma entre las categorías de GRUPO .	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,451	Conserve la hipótesis nula.
2	La distribución de clinica6clinica0 es la misma entre las categorías de GRUPO .	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,539	Conserve la hipótesis nula.
3	La distribución de clinica6clinica3 es la misma entre las categorías de GRUPO .	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,970	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

Variable Rayos x:

Del mismo modo que hemos comparado la evaluación de la variable Clínica a lo largo de los 6 meses y para los dos grupos vamos a realizar lo mismo para la variable rx. Es importante destacar que esta prueba, por los efectos de la radiación solo se realiza al comienzo y al final del estudio.

Estadísticas de muestras emparejadas

		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Par 1	rx6	81,08229730	74	10,57773878	1,229637156
	rx 0	79,8351	74	10,65064	1,23811

Prueba de muestras emparejadas

		Diferencias emparejadas				t	gl	Sig. (bilateral)	
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
					Inferior				Superior
Par 1	rx6 - rx 0	1,247162162	2,009114519	,233554819	,781688080	1,712636245	5,340	73	,000

No paramétricas

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La mediana de las diferencias entre rx 0 y rx6 es igual a 0.	Prueba de Wilcoxon de los rangos con signo para muestras relacionadas	,000	Rechace la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

Estadísticas de grupo

	GRUPO	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
Rx 0	,0	29	78,8100	12,25078	2,27491
	1,0	46	78,7676	15,06330	2,22096
rx6	,0	29	79,80620690	12,06737674	2,240855606
	1,0	45	81,90466667	9,549873298	1,423611058

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de x es la misma entre las categorías de GRUPO.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,333	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

En este caso, al igual que para la variable Clínica obtenemos una mejora en la enfermedad en los pacientes pero no existen evidencias estadísticas de diferencias entre el grupo de control y el grupo en estudio.

Variable foto

Finalmente, para el estudio de la variable Foto

Estadísticas de muestras emparejadas

		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Par 1	foto 3	,94682770	87	,937338486	,100493234
	foto 0	1,10969437	87	,954124742	,102292910
Par 2	foto 6	,77497222	87	,844379166	,090526949
	foto 0	1,10969437	87	,954124742	,102292910
Par 3	foto 6	,74913981	90	,841732021	,088726345
	foto 3	,91526678	90	,937122630	,098781399

Prueba de muestras emparejadas

		Diferencias emparejadas				t	gl	Sig. (bilateral)	
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
					Inferior				Superior
Par 1	foto 3 - foto 0	-,162866667	,313695719	,033631711	-,229724296	-,096009037	-4,843	86	,000
Par 2	foto 6 - foto 0	-,334722149	,447680821	,047996422	-,430135879	-,239308420	-6,974	86	,000
Par 3	foto 6 - foto 3	-,166126967	,369012072	,038897288	-,243415049	-,088838884	-4,271	89	,000

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La mediana de las diferencias entre foto 6 y foto 3 es igual a 0.	Prueba de Wilcoxon de los rangos con signo para muestras relacionadas	,000	Rechace la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La mediana de las diferencias entre rangos con foto 6 y foto 0 es igual a 0.	Prueba de Wilcoxon de los signo para muestras relacionadas	,000	Rechace la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La mediana de las diferencias entre rangos con foto 0 y foto 3 es igual a 0.	Prueba de Wilcoxon de los signo para muestras relacionadas	,000	Rechace la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

En este caso, mediante el contraste de la u mann-whitney podemos observar que si existen evidencias estadísticas de diferencias significativas entre el grupo de control y el grupo en estudio 1, resultado este grupo con mejores resultados y al ser estas diferencias positivas mayores en el grupo 0.