

Efecto de soluciones antisépticas sobre la microbiota de la biopelícula dental de caninos (*Canis familiaris*)

Claudia María Bedoya-Correa¹, Emilia María Ochoa-Acosta²,
Luz Adriana Isaza-Soto³, Manuela Jaramillo-López⁴, Lina María López-David⁵,
Valentina Monsalve-Jiménez⁶, Manuela Murillo-Henao⁷

* Artículo de investigación.

1 Bióloga, MSc. Ciencias Odontológicas. Grupo GIOM, Facultad de Odontología, Universidad Cooperativa de Colombia-Campus Medellín, Medellín, Antioquia, Colombia.

✉ claudia.bedoyac@campusucc.edu.com

<https://orcid.org/0000-0001-5987-398X>

2 Odontóloga, PhD. Ciencias Sociales. Grupo GIOM, Facultad de Odontología, Universidad Cooperativa de Colombia-Campus Medellín, Colombia.

✉ emilia.ochoa@campusucc.edu.co

<https://orcid.org/0000-0001-6765-5712>

3 Odontóloga. Facultad de Odontología, Universidad Cooperativa de Colombia-Campus Medellín, Colombia.

✉ luz.isazas@campusucc.edu.co

<https://orcid.org/0009-0009-1376-0715>

4 Odontóloga. Facultad de Odontología, Universidad Cooperativa de Colombia-Campus Medellín, Colombia.

✉ manuela.jaramillo@campusucc.edu.co

<https://orcid.org/0009-0006-8007-473X>

5 Odontóloga. Facultad de Odontología, Universidad Cooperativa de Colombia-Campus Medellín, Colombia.

✉ lina.lopezd@campusucc.edu.co

<https://orcid.org/0009-0003-4956-6427>

Cómo citar este artículo: Bedoya-Correa CM, Ochoa-Acosta EM, Isaza-Soto LA, Jaramillo-López M, López-David LM, Monsalve-Jiménez V y Murillo-Henao M. Efecto de soluciones antisépticas sobre la microbiota de la biopelícula dental de caninos (*Canis familiaris*). Rev Med Vet. 2024;(49):e0008. <https://doi.org/10.19052/mv.vol1.iss49.8>

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Resumen

La microbiota oral canina está compuesta por comunidades polimicrobianas que en condiciones de homeostasis desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la salud oral. Sin embargo, cuando se altera este equilibrio, se generan cambios en estas comunidades, lo que conlleva al desarrollo de patologías como la enfermedad periodontal. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto antimicrobiano de antisépticos de uso frecuente para la higiene oral de caninos (*Canis familiaris*) sobre la microbiota de la biopelícula dental. El estudio se realizó en dos fases: en la fase I, se hizo un estudio experimental *in vitro* para determinar la actividad antimicrobiana de 3 antisépticos orales con clorhexidina como componente activo. En la fase II, se realizó un estudio de intervención tipo longitudinal donde se incluyeron 24 caninos divididos en 3 grupos, a los cuales se les aplicó un antiséptico oral diferente durante 30 días. Posteriormente, se recolectó biopelícula dental en distintos intervalos de tiempo y se calculó el porcentaje de inhibición de biopelícula. El efecto antimicrobiano *in vitro* de los antisépticos fue similar; no se encontraron diferencias significativas en los diámetros de los halos de inhibición. Luego de la aplicación tópica, se determinó que la disminución de la biopelícula generada por la solución antiséptica 1 fue más constante y homogénea en el tiempo, en comparación con las soluciones 2 y 3. Se demostró *in vivo* que las tres soluciones poseen actividad antimicrobiana significativa, por consiguiente, su uso periódico, disminuye significativamente la formación de biopelícula dental en caninos.

Palabras clave: caninos; salud oral; biopelícula dental; enfermedad periodontal.

6 Odontóloga. Facultad de Odontología, Universidad Cooperativa de Colombia-Campus Medellín, Colombia.

✉ valentina.monsalvej@campusucc.edu.co

<https://orcid.org/0009-0006-5300-0305>

7 Odontóloga. Facultad de Odontología, Universidad Cooperativa de Colombia-Campus Medellín, Medellín, Antioquia, Colombia.

✉ manuela.murilloh@campusucc.edu.co

<https://orcid.org/0009-0006-0669-8210>

Effect of antiseptic solutions on oral biofilm microbiota of canines (*Canis familiaris*)

Abstract

The oral microbiota of canines is composed of polymicrobial communities that, under homeostatic conditions, play a significant role in maintaining the oral health status. However, when this balance is altered, these communities change, which leads to the development of different conditions, such as periodontal disease. The objective of this work was to assess the antimicrobial effect of antiseptic solutions, used regularly for oral hygiene procedures in canines (*Canis familiaris*), on the oral biofilm microbiota. This work was divided into two phases: the first phase consisted of an *in vitro* experimental assay to determine the antimicrobial activity of three oral antiseptic solutions using chlorhexidine as the main active component. During phase II, a longitudinal, intervention procedure was performed using 24 canines divided into 3 groups; every group received a different oral antiseptic solution for 30 days. Oral biofilm was collected at different time intervals and the percentage of biofilm inhibition was calculated. The *in vitro* antimicrobial effect of all the solutions was similar and the inhibition haloes did not show any significant differences. After topical application, it was observed that antiseptic solution 1 showed a more consistent and homogeneous biofilm reduction when compared to solutions 2 and 3. *In vivo*, all three solutions exhibited a significant antimicrobial activity. Therefore, the regular use of antiseptic solutions significantly reduced the formation of oral biofilm in canines.

Keywords: canine; oral health; dental biofilm; periodontal disease.

INTRODUCCIÓN

La microbiota oral canina es altamente diversa y está formada por comunidades polimicrobianas comensales. Factores como el tipo de alimentación, los regímenes de cuidado, el estado de salud-enfermedad y la edad del canino, pueden afectar el equilibrio ecológico de la cavidad oral, ocasionando un cambio en las comunidades microbianas, lo que conlleva al desarrollo de diferentes patologías (1, 2). Una de las patologías orales más frecuente en caninos ocasionada como consecuencia de la alteración de la homeostasis de la cavidad oral es la enfermedad periodontal (EP), la cual es considerada como un proceso patológico progresivo que se origina a partir de la adhesión y acumulación excesiva de bacterias que forman biopelículas a nivel subgingival (3-5). Estas bacterias secretan productos metabólicos como amoníaco y compuestos volátiles de azufre, que ocasionan halitosis, así como enzimas proteolíticas y endotoxinas, que promueven la inflamación y la activación del sistema inmunológico del canino (6-8). La gingivitis es considerada la etapa inicial de la EP donde la inflamación ocurre a nivel de la encía. Sin tratamiento, esta puede convertirse en periodontitis, la cual involucra las estructuras de soporte más profundas del diente (ligamento periodontal y hueso alveolar), que conlleva a la destrucción de los tejidos con la subsiguiente pérdida de inserción dental. Esta enfermedad además de generar dolor, trae consecuencias graves tanto a nivel local como sistémicas (6, 9).

La EP es una de las patologías más comunes que afectan a caninos de diferentes razas, sexo y edad (10). La prevalencia de esta enfermedad oscila entre el 44 y el 64 %, alcanzando hasta un 80 % en perros mayores de 3 años (11, 12). Se ha reportado que en los caninos hay un acumulo de biopelícula mucho mayor que en los humanos, esto soporta la razón del porqué la EP es la más prevalente frente a otras patologías encontradas en caninos (10). Los dientes más afectados por esta patología son los premolares y los dientes maxilares, y

entre más avanzada la edad de los caninos, mayor probabilidad de perder estructuras dentales. Por consiguiente, el propósito de la prevención y el tratamiento de la EP en caninos es mantener la encía clínicamente sana al disminuir la formación y acumulación de biopelícula en las superficies dentales para evitar la inflamación (9).

Aunque la eliminación de la biopelícula dental por acción mecánica (cepillado de dientes) es el mejor método de prevención de enfermedades orales, rara vez se consigue debido a la falta de compromiso por parte del cuidador o por la carencia de habilidad técnica para realizar el cepillado, además, por la no aceptación del proceso por parte del canino (9, 13). Por tanto, la inhibición de la adherencia bacteriana mediante el uso de agentes químicos también puede controlar la formación de la biopelícula, particularmente en caninos a los que el cepillado de dientes no se les realiza de manera periódica (13). Se ha demostrado que la clorhexidina (CHX) es el principal antiséptico de amplio espectro para el control químico de la biopelícula oral, porque presenta baja toxicidad y su naturaleza catiónica ocasiona daño a nivel de la pared celular y precipita el citoplasma bacteriano, además, la CHX tiene propiedades antifúngicas y antivirales. Posee alta sustentividad, es decir, se une a proteínas salivares para ser liberada paulatinamente en dosis efectivas que garantizan la persistencia de su actividad antimicrobiana (8, 14, 15).

Es necesario comprender que la alteración de las comunidades microbianas de la biopelícula puede generar diversos procesos patológicos y que el mantenimiento de la homeostasis oral es fundamental para prevenir inflamación de los tejidos, abscesos, pérdida de estructura dental, pérdida de hueso, y repercusiones directas sobre la salud en general de los caninos. Por consiguiente, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto antimicrobiano de productos de uso frecuente para la higiene oral de caninos (*Canis familiaris*) sobre la microbiota de la biopelícula dental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

Este trabajo se llevó a cabo en dos fases. En la fase I se realizó un estudio experimental *in vitro* con muestras de biopelícula dental colectadas de 5 caninos diferentes, y en la fase II, un estudio de intervención longitudinal. Para realizar la segunda fase de este estudio, se contó con una muestra de 24 caninos (*C. familiaris*) entre los 2 y 9 años de edad ubicados en el área metropolitana de la ciudad de Medellín, Colombia. Los caninos incluidos en este estudio eran de diferentes razas y tamaños, con alimentación combinada o concentrados. Se excluyeron caninos que estuvieran en tratamiento farmacológico con terapia antibiótica o antimicótica tres meses previos a la toma de la muestra. Los cuidadores de los caninos recibieron información sobre los objetivos del estudio y firmaron un consentimiento informado antes de la toma de la muestra. Todos los caninos empleados en este estudio fueron manejados en estricta concordancia con lo establecido por la Ley 84 de 1989 (Estatuto Nacional de Protección de los Animales). Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de la de la Universidad Cooperativa de Colombia (008/2020).

Recolección de muestras de biopelícula dental

Antes de recolectar la biopelícula se indicó a los cuidadores de los caninos suspender el uso de cremas dentales, enjuagues bucales y/o juguetes masticables al menos siete días previos a la toma de la muestra y durante el tiempo de exposición al tratamiento. La muestra de biopelícula se colectó con una cucharilla odontológica estéril abarcando todos los dientes de la hemiarcada superior derecha, a nivel de la zona cervical. La muestra fue transferida a un asa calibrada estéril de 1 μ L hasta colectar un total de 10 μ L de biopelícula y se depositó dentro un tubo *ependorf* que contenía 490 μ L de solución salina al 0,9% (Corpaul, Colombia) y tres perlas de vidrio estériles para ayudar a disgregar

la biopelícula. Las muestras se almacenaron temporalmente a 4 °C en hielo y fueron transportadas al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Cooperativa de Colombia, campus Medellín, para procesarlas dentro de las siguientes dos horas.

Fase I. Actividad antimicrobiana *in vitro* de soluciones antisépticas orales sobre microorganismos aislados de biopelícula dental de caninos

En este ensayo *in vitro* se evaluaron 3 productos antisépticos comercialmente disponibles empleados en la higiene oral de caninos. Los productos evaluados fueron codificados como: solución antiséptica 1 (SA-1), solución antiséptica 2 (SA-2) y solución antiséptica 3 (SA-3). La actividad antimicrobiana de las soluciones antisépticas se evaluó sobre microorganismos aislados de biopelícula dental de caninos diferentes mediante la prueba de difusión en agar.

Preparación del inóculo microbiano

Muestras de biopelícula dental de 5 caninos diferentes se colectaron como se reportó anteriormente. Estas muestras fueron depositadas de manera independiente en 490 μ L de solución salina estéril al 0,9% y se agitaron en vortex (Heidolph Reax top, Germany) durante 1 min para separar el conglomerado microbiano de la biopelícula. Posteriormente, la turbidez de las suspensiones celulares se ajustó a 0,5 de la escala de McFarland, esto equivale a una concentración celular de $1-2 \times 10^8$ UFC/ml (Unidades Formadoras de Colonias por mililitro).

Prueba de sensibilidad

Para determinar la susceptibilidad de los microorganismos de la biopelícula dental de los caninos frente a las soluciones antisépticas, se realizó la prueba de difusión en agar mediante el método de Kirby-Bauer descrito por Bauer et al. (16) y modificado por el CLSI

(Clinical and Laboratory Standards Institute) (17). En resumen, un hisopo de algodón estéril se sumergió de manera independiente en cada una de las 5 suspensiones celulares y se colocó en la superficie del medio de cultivo Agar Müller-Hinton (Merck KGaA, Germany), extendiéndose de forma paralela abarcando toda la superficie del agar, este proceso se repitió rotando la placa 60° y se dejó secar durante 5 min dentro de la cámara de flujo laminar (BioBase, China). Para realizar la prueba de difusión en agar, discos de filtro estériles se impregnaron con 10 µL de las soluciones antisépticas SA-1, SA-2 y SA-3. Adicionalmente, se utilizó CHX al 0,2% (Clorhexol, Farpag S.A.S., Colombia) como control positivo y solución salina al 0,9% como control negativo. Los discos se ubicaron de manera equidistante en la superficie del agar con una pinza metálica estéril, presionando suavemente para permitir su adherencia. Los cultivos se dejaron reposar durante 15 min a temperatura ambiente para facilitar la difusión de las soluciones, y posteriormente, se incubaron de manera invertida en microaerofilia a 37 °C durante 24 h en una atmosfera de 5% de CO₂. Después del periodo de incubación, se midió el diámetro de la zona de inhibición. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Fase II. Efecto de la aplicación tópica de las soluciones antisépticas en la cavidad oral de caninos

Para determinar la actividad antimicrobiana *in vivo* de las soluciones antisépticas evaluadas en la fase I sobre la microbiota de la biopelícula dental, se seleccionaron 24 caninos. Previa a la aplicación tópica de los antisépticos, se conformaron de manera aleatoria tres grupos. Grupo I- caninos tratados con SA-1 (n=8), Grupo II- Caninos tratados con SA-2 (n=8), y Grupo III- Caninos tratados con SA-3 (n=8).

A los caninos de cada grupo se les aplicó diariamente, y durante un mes, tres aspersiones de cada producto antiséptico directamente sobre los dientes de la hemiarcada superior derecha. Posteriormente, se

colectaron muestras de biopelícula dental en diferentes intervalos de tiempo, en el día 0 previo a la aplicación del tratamiento, día 10, día 20 y día 30 después de la aplicación tópica del tratamiento.

Procesamiento microbiológico de las muestras

Las muestras de biopelícula dental colectadas en los diferentes intervalos de tiempo se agitaron en vortex durante 1 min y se realizaron microdiluciones seriadas en solución salina al 0,9%. Para realizar el recuento de células viables, alícuotas de 10 µL de las diluciones 10⁻¹-10⁻⁶ fueron inoculadas por duplicado en Agar BHI (Difco Laboratories, France) mediante el método de gota. Los cultivos se incubaron a 37 °C en microaerofilia (5% de CO₂) por 48 h para permitir el crecimiento completo de las colonias. Finalmente, la actividad antimicrobiana se determinó mediante la obtención del porcentaje de inhibición de crecimiento para cada solución antiséptica, utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Inhibición} = [(UFC_{inicial} - UFC_{final}) / UFC_{inicial}] \times 100$$

Donde UFC_{inicial} corresponde a las Unidades Formadoras de Colonias antes de la exposición a la solución antiséptica; y UFC_{final}, Unidades Formadoras de Colonias después de la exposición a la solución antiséptica.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando el programa IBM SPSS versión 28. Se realizó una descripción de las características zoográficas de los caninos y los resultados de inhibición del crecimiento microbiano, tanto *in vitro* como *in vivo*, fueron calculados mediante la estimación de frecuencias relativas y absolutas o medidas de resumen según la naturaleza de las variables. Para comparar la inhibición del crecimiento generada por las soluciones antisépticas evaluadas *in vitro* e *in vivo*, los resultados se examinaron mediante la prueba H de

Kruskal Wallis, dado el incumplimiento del supuesto de distribución normal verificado con la prueba de Shapiro Wilk. Para aquellos casos donde se presentó significación estadística se realizó un análisis de comparaciones múltiples mediante la prueba U de Mann Whitney con corrección de Bonferroni. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

RESULTADOS

Población de estudio

La edad promedio de los caninos seleccionados fue de 4,43 años. Se evidenció una mayor prevalencia de machos (58,3 %) que de hembras (41,7 %) y se pudo observar que predominaron los caninos de tamaño grande (54,2 %). El tipo de alimentación proporcionada por los cuidadores fue con mayor frecuencia la alimentación de tipo combinada (70,8 %) (Tabla 1).

Tabla 1. Características zoológicas de los caninos

Variable	Caninos (n = 24)	
Sexo	Macho	14 (58,3%)
	Hembra	10 (41,7%)
Tamaño	Pequeño	2 (8,3%)
	Mediano	9 (37,5%)
	Grande	13 (54,2%)
Tipo de alimentación	Concentrado	7 (29,2%)
	Combinada	17 (70,8%)
Edad (Media ± DE)	4,43 ± 3,02	

Efecto antimicrobiano *in vitro* de las soluciones antisépticas orales sobre microorganismos aislados de la biopelícula dental de caninos

La actividad antimicrobiana de las soluciones antisépticas orales fue evaluada mediante el ensayo de difusión en agar utilizando como blanco microorganismos

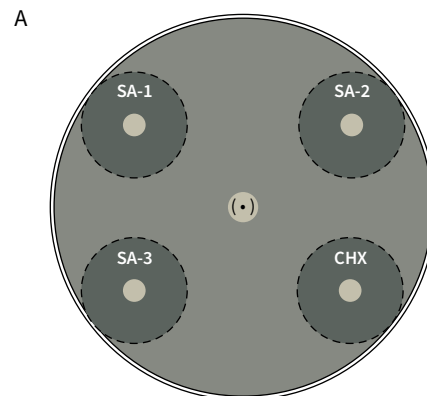
aislados de biopelícula dental de caninos. En la Tabla 2 se muestra la composición química de las 3 soluciones antisépticas orales empleadas en este estudio.

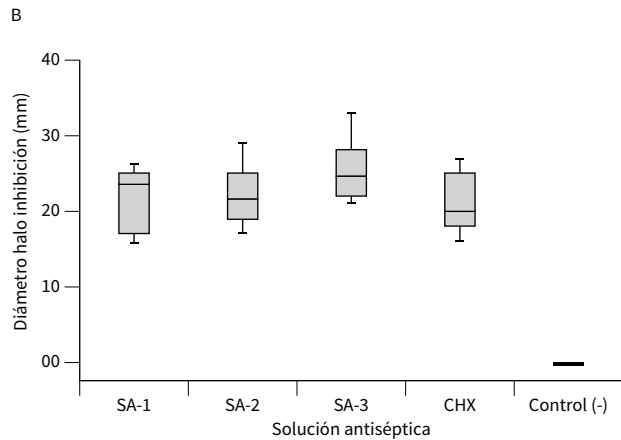
Los resultados *in vitro* demostraron que las soluciones antisépticas analizadas exhibieron una actividad inhibitoria alta (Figura 1a), y fue posible determinar que los diámetros de los halos de inhibición fueron similares (Figura 1b). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las soluciones antisépticas ni con el control positivo ($p=0,131$). Lo anterior indica que todas las soluciones antisépticas demostraron tener una actividad antimicrobiana similar (Tabla 3), por lo tanto, fueron utilizadas en la fase *in vivo* del estudio.

Tabla 2. Composición de las soluciones antisépticas orales empleadas para la higiene oral de caninos

Solución antiséptica	Composición
SA-1	Gluconato de clorhexidina 0,21 g (equivalente a 0,12 g de clorhexidina base)
SA-2	Clorhexidina acetato 100 mg
	Excipientes. c.s.p 100 ml
SA-3	Clorhexidina digluconato 0,5 g (equivalente a 0,26 g de clorhexidina base)
	Excipientes. c.s.p 100 ml

Figura 1. Efecto inhibitorio de soluciones antisépticas orales y CHX al 0,2% sobre microorganismos aislados de biopelícula dental de caninos





a). Prueba de difusión en agar de soluciones antisépticas orales frente a microorganismos aislados de biopelícula de un canino. SA-1 (solución antiséptica 1), SA-2 (solución antiséptica 2), SA-3 (solución antiséptica 3), CHX (control positivo), control negativo (solución salina 0,9%); b) diámetros de las zonas de inhibición (mm)

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de soluciones antisépticas orales sobre microorganismos aislados de biopelícula dental de caninos

Solución antiséptica	Halo de inhibición (mm)	Valor <i>p</i>
	Mediana (RIQ)	
SA-1	23,5 (17,0–25,0)	0,131
SA-2	21,5 (19,0–25,0)	
SA-3	24,5 (22,0–28,0)	
CHX	20,0 (18,0–25,0)	

Prueba H de Kruskal Wallis. RIQ: rango intercuartílico. CHX: control positivo, clorhexidina al 0,2%.

Efecto de la aplicación tópica de las soluciones antisépticas en la cavidad oral de caninos

Luego de determinar *in vitro* que las soluciones antisépticas presentaron alta actividad antimicrobiana, se procedió a realizar la aplicación tópica de cada una de ellas en la cavidad oral de los caninos. En la tabla 4 se describe la distribución de cada grupo y el tratamiento antiséptico aplicado. Antes de iniciar el tratamiento, y después de cada exposición, se realizó un recuento de células viables y se calculó el porcentaje de inhibición de la microbiota de la biopelícula dental (Tabla 5).

Tabla 4. Distribución de los grupos de caninos y tratamiento antiséptico aplicado

Variable	Categoría	n
Grupo I-Antiséptico SA-1		
Sexo	Macho	5
	Hembra	3
Tamaño	Pequeño	1
	Mediano	3
	Grande	4
Tipo de alimentación	Concentrado	2
	Combinada	6
Grupo II-Antiséptico SA-2		
Sexo	Macho	5
	Hembra	3
Tamaño	Pequeño	0
	Mediano	3
	Grande	5
Tipo de alimentación	Concentrado	2
	Combinada	6
Grupo III-Antiséptico SA-3		
Sexo	Macho	4
	Hembra	4
Tamaño	Pequeño	1
	Mediano	3
	Grande	4
Tipo de alimentación	Concentrado	3
	Combinada	5

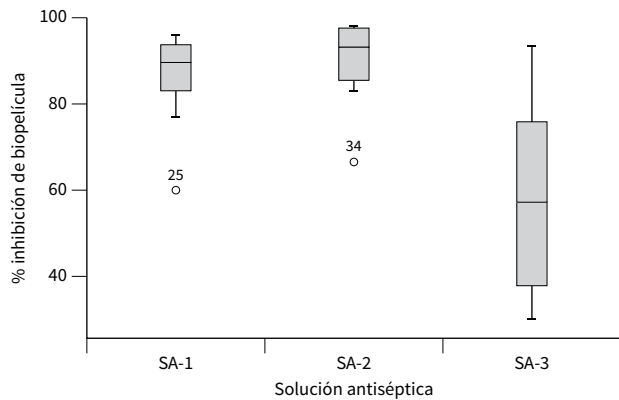
Tabla 5. Porcentaje de inhibición de la biopelícula dental de caninos en diferentes tiempos de aplicación tópica de las soluciones antisépticas

Solución antiséptica	T10-Inhibición (%)	T20-Inhibición (%)	T30-Inhibición (%)
	Mediana (RIQ)	Mediana (RIQ)	Mediana (RIQ)
SA-1	90,0 (83,5–94,3)	95,0 (92,0–97,2)	91,0 (89,5–95,0)
SA-2	93,7 (85,8–97,9)	65,9 (36,7–87,7)	96,7 (94,9–98,8)
SA-3	57,4 (37,9–76,2)	96,7 (95,5–97,4)	97,6 (92,1–98,3)
Valor <i>p</i>	*0,015	*0,044	0,073

**p*<0,05. Prueba H de Kruskal Wallis. RIQ: rango intercuartílico. T10: inhibición de biopelícula después de 10 días de aplicación tópica, T20: inhibición de biopelícula después de 20 días de aplicación tópica, T30: inhibición de biopelícula después de 30 días de aplicación tópica.

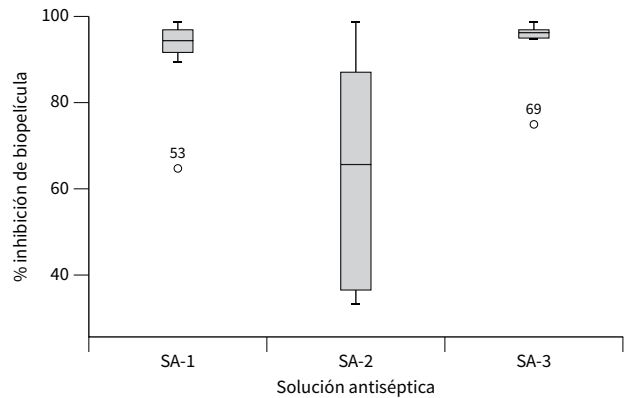
Al analizar los resultados, se evidenció que las 3 soluciones antisépticas disminuyeron la formación de la biopelícula dental durante los primeros 10 días de aplicación. Sin embargo, la solución SA-2 exhibió porcentajes significativamente mayores comparado con la inhibición generada luego de la aplicación de la solución SA-3 ($p=0,016$). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre las soluciones SA-2 y SA-1 ($p=1,00$) (Figura 2).

Figura 2. Porcentaje de inhibición de biopelícula dental de caninos después de 10 días de la aplicación tópica de las soluciones antisépticas orales



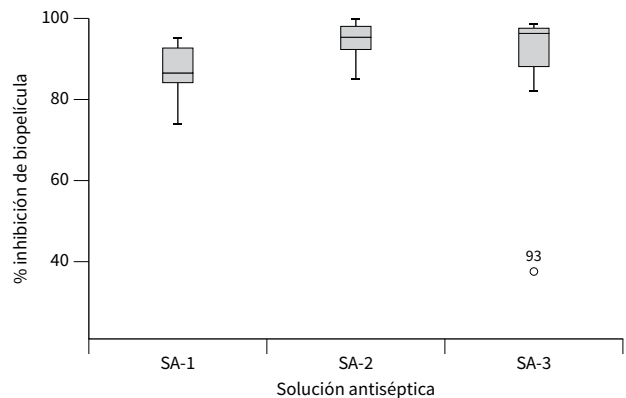
En la figura 3 se observa que 20 días después de la aplicación de las soluciones antisépticas sobre las superficies dentales de los caninos, SA-3 generó una inhibición significativamente mayor en comparación con SA-2 ($p=0,028$). Por otro lado, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de inhibición de SA-1 y SA-3 ($p=0,10$). Pese a que después de 10 días de exposición a la solución SA-2 se obtuvieron los mayores porcentajes de inhibición (mediana 93,7%), se pudo evidenciar que, 20 días después de haber iniciado el tratamiento, la microbiota de la biopelícula dental se restableció y su inhibición disminuyó considerablemente (mediana 65,9%). Lo contrario se observa con el efecto producido por SA-3, el cual ocasionó porcentajes de inhibición menores 10 días después de su aplicación (mediana 57,4%), sin embargo, después de 20 días de aplicación diaria se generó una inhibición significativa (mediana 96,7%) en comparación las demás soluciones antisépticas.

Figura 3. Porcentaje de inhibición de biopelícula dental de caninos después de 20 días de la aplicación tópica de las soluciones antisépticas orales



Por último, 30 días después de la exposición a las soluciones antisépticas, la inhibición de la biopelícula dental de los caninos fue más homogénea y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p=0,073$), lo que indica que las tres soluciones presentaron un efecto antimicrobiano *in vivo* similar un mes después de su aplicación tópica (Figura 4).

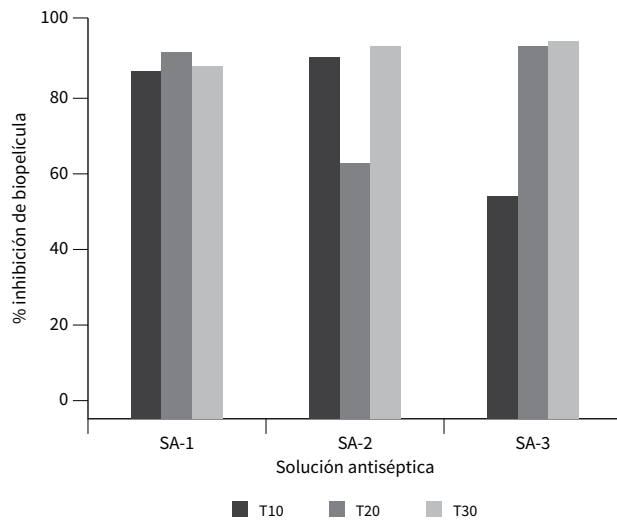
Figura 4. Porcentaje de inhibición de biopelícula dental de caninos después de 30 días de la aplicación tópica de las soluciones antisépticas orales



En la figura 5, se integran los porcentajes de inhibición generados por las tres soluciones antisépticas en los diferentes tiempos de exposición. En esta figura se puede observar que la inhibición incrementa en la mayoría de los casos analizados, sin embargo, SA-1

generó una reducción de biopelícula dental considerable después de 10 días de aplicación tópica (90 %), y su efecto antimicrobiano fue relativamente constante durante el tiempo de exposición. En contraste, el porcentaje de inhibición de SA-2 no fue homogéneo y la eficacia de SA-3 fue mayor 20 días después de aplicar el tratamiento

Figura 5. Inhibición de biopelícula dental (%) de caninos después de la aplicación tópica de soluciones antisépticas orales



T10: 10 días de exposición, T20: 20 días de exposición, T30: 30 días de exposición

DISCUSIÓN

La naturaleza polimicrobiana de la biopelícula es considerada el factor causal de diferentes enfermedades orales en caninos. Si esta biopelícula no se remueve periódicamente por falta de medidas de higiene oral, se genera un acúmulo en exceso de microorganismos, que a nivel local, puede ocasionar inflamación y destrucción de los tejidos periodontales (13), además, la diseminación de estos microorganismos y sus toxinas a través del torrente sanguíneo, pueden traer consecuencias a nivel sistémico, como daño renal, hepático o cardíaco (8, 18, 19). Por consiguiente, la disminución de la formación de la biopelícula dental es esencial para mantener la salud de los caninos. En este trabajo

se evaluaron tres soluciones antisépticas empleadas comercialmente para la higiene oral de caninos con CHX como componente activo, para determinar su actividad antimicrobiana *in vitro* sobre células planctónicas y su capacidad de inhibir la formación de biopelícula dental *in vivo*. Múltiples estudios han demostrado la eficacia de la CHX en la inhibición del crecimiento microbiano (20-23), validando su uso como control positivo para comparar otras formulaciones, incluidas las que contienen CHX en diferentes concentraciones (22).

Los resultados obtenidos en la fase I de esta investigación, demostraron que las tres soluciones antisépticas evaluadas tuvieron un efecto antimicrobiano *in vitro* similar sobre el conglomerado de microorganismos aislados de la biopelícula dental de caninos. Estos resultados concuerdan con los publicados por Ronanki et al. (22), quienes evaluaron el efecto antimicrobiano *in vitro* de enjuagues bucales que contenían el mismo ingrediente activo (CHX) pero en diferentes concentraciones (0,2 %, 0,12 % y 0,1 %) frente a cultivos planctónicos de cepas individuales de cavidad oral, *Actinomyces viscosus* (ATCC 3268), *Candida albicans* (MTCC 183), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus mutans* (ATCC 21293), *S. sanguis* (MTCC 442) y *S. pyogenes* (MTCC 4429). Los autores demostraron la eficacia antimicrobiana de los enjuagues bucales sobre las cepas de referencia evaluadas y concluyeron que los enjuagues con CHX al 0,1 % y al 0,12 % exhibieron una eficacia comparable con los enjuagues bucales con CHX al 0,2 %, independientemente de sus formulaciones.

Resultados similares se evidenciaron en un modelo de biopelícula mono especie *in vitro*, donde se evaluaron tres especies bacterianas que se encuentran comúnmente en la biopelícula subgingival de caninos, *Porphyromonas gulae*, *Actinomyces canis* y *Neisseria canis*. En este estudio se investigó el efecto de la CHX al 0,12 %, Tris-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético de trometamina) y una combinación de ambos, sobre biopelículas previamente formadas. Después de 24 h de exposición, se determinó que en la biopelícula

tratada con la mezcla de CHX al 0,12 % y Tris-EDTA, los recuentos (UFC/ml) de *P. gulae* fueron más bajos en comparación con el tratamiento realizado solo con CHX al 0,12 %, por lo que se concluye, en ese modelo *in vitro*, que esta mezcla tiene un efecto sinérgico contra esta especie. Sin embargo, se generó una mayor reducción en el número de UFC/ml de *A. canis* y *N. canis* solo con el tratamiento de CHX al 0,12 %, destacando la eficacia de la CHX en la inhibición *in vitro* de bacterias orales de caninos (23).

En la fase II de este estudio se evaluó la eficacia antimicrobiana de tres soluciones antisépticas después de 30 días de aplicación tópica. Estos resultados concuerdan con los reportados en un trabajo realizado para detectar la deposición de biopelícula en 32 caninos. Los investigadores dividieron a los caninos en 4 grupos. Grupo 1, conformado por caninos sin ningún tipo de cuidado dental, grupo 2, caninos que recibieron una provisión de masticables dentales dos veces al día después de la comida, grupo 3, caninos a los que se les aplicó CHX al 0,2 % dos veces al día después de cada alimentación, y grupo 4, caninos a los que se les combinó el tratamiento de CHX más el masticable dental. Los grupos que recibieron de forma independiente CHX y masticables dentales exhibieron una disminución significativa de biopelícula luego de 28 días de iniciado el tratamiento. Sin embargo, se encontró que el efecto combinado de la CHX más los masticables dentales fue el más efectivo debido a que el 100 % de los caninos permanecieron libres de depósitos de biopelícula fresca, lo que concluye que la implementación de métodos químicos y mecánicos potencializan la eliminación de biopelícula dental (24).

Aunque las soluciones antisépticas analizadas en el presente estudio contenían CHX en diferentes concentraciones, presentaron un efecto antimicrobiano *in vivo* similar un mes después de su uso ($p=0,073$). No obstante, ningún antiséptico generó una inhibición completa de la biopelícula dental en los caninos. Se ha reportado que los microorganismos que constituyen las biopelículas son varios órdenes de magnitud más resistentes a agentes químicos en comparación

con sus contrapartes planctónicas, por lo tanto, desempeñan un papel significativo en la persistencia de infecciones bacterianas (25, 26). Singh et al. (27) y Li et al. (28), argumentan que la difusión limitada de los antimicrobianos a través de la matriz de la biopelícula, la expresión diferencial genes de resistencia, la adaptación genética, entre otros factores, hacen que se genere mayor resistencia de las bacterias cuando estas crecen en biopelículas. Debido a esta resistencia intrínseca, la eliminación de biopelículas es considerablemente más compleja cuando se emplean agentes antimicrobianos, los cuales exhiben en las células planctónicas resultados de erradicación significativos (28, 29).

CONCLUSIONES

Es relevante reconocer a la biopelícula como un complejo dinámico que en condiciones de homeostasis desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la salud oral, y que la microbiota oral residente previene el establecimiento y colonización de microorganismos patógenos. En consecuencia, es necesario implementar tratamientos que controlen la proliferación de poblaciones microbianas potencialmente patógenas, sin alterar o eliminar la microbiota protectora asociada a salud oral.

Pese a que los microorganismos que hacen parte de las biopelículas presentan gran resistencia frente a agentes antimicrobianos, se demostró que las 3 soluciones antisépticas con CHX como componente activo poseen actividad antimicrobiana significativa sobre estos conglomerados multiespecie. La aplicación periódica de estos antisépticos orales controla la formación de biopelícula dental en caninos. Sin embargo, el uso prolongado de CHX podría generar pigmentación del esmalte y activación de mecanismos de resistencia bacteriana, por consiguiente, se debe considerar disminuir su exposición. Por esta razón, la solución SA-1 es considerada la mejor opción para controlar la formación de biopelícula dental y prevenir la EP en caninos, porque entre 10 y 20 días de exposición genera un porcentaje de inhibición constante superior al 90 %.

REFERENCIAS

1. Bell SE, Nash AK, Zanghi BM, Otto CM, Perry EB. An assessment of the stability of the canine oral microbiota after probiotic administration in healthy dogs over time. *Front Vet Sci.* 2020;7:616. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00616>
2. Dewhirst FE, Klein EA, Thompson EC, Blanton JM, Chen T, Milella L, et al. The canine oral microbiome. *PLoS One.* 2012;7(4):e36067. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036067>
3. Van Dyke TE. The etiology and pathogenesis of periodontitis revisited. *J. Appl. Oral Sci.* 2009;17(1). <https://doi.org/10.1590/s1678-77572009000100001>
4. Larraín Y, Fernández V. Evaluación de la severidad de la enfermedad periodontal en dientes premolares superiores en comparación a los dientes premolares inferiores en pacientes caninos. *Rev Inv Vet Perú.* 2017;28(2):370-375. <http://doi.org/10.15381/rivep.v28i2.13060>
5. Stella JL, Bauer A E, Croney CC. A cross-sectional study to estimate prevalence of periodontal disease in a population of dogs (*Canis familiaris*) in commercial breeding facilities in Indiana and Illinois. *PLoS ONE.* 2018;13(1):e0191395. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191395>
6. Niemiec BA. Periodontal Disease. *Top Companion Anim Med.* 2008;23(2):72-80. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2008.02.003>
7. Carroll MQ, Oba PM, Sieja KM, Alexander C, Lye L, de Godoy MRC, et al. Effects of novel dental chews on oral health outcomes and halitosis in adult dogs. *J Anim Sci.* 2020;98(9):skaa274. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa274>
8. Cunha E, Tavares L, Oliveira M. Revisiting Periodontal Disease in Dogs: How to Manage This New Old Problem? *Antibiotics.* 2022;11(12):1729. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121729>
9. Wallis C, Holcombe LJ. A review of the frequency and impact of periodontal disease in dogs. *J Small Anim Pract.* 2020;61(9):529-540. <https://doi.org/10.1111/jsap.13218>
10. Colmery B, Frost P. Periodontal disease: etiology and pathogenesis. *Vet Clin North Am Small.* 1986;16(5):817-833. [https://doi.org/10.1016/s0195-5616\(86\)50303-x](https://doi.org/10.1016/s0195-5616(86)50303-x)
11. Wallis C, Marshall M, Colyer A, O'Flynn C, Deusch O, Harris S. A longitudinal assessment of changes in bacterial community composition associated with the development of periodontal disease in dogs. *Vet Microbiol.* 2015;181(3-4):271-282. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.09.003>
12. Lindinger MI. Reduced dental plaque formation in dogs drinking a solution containing natural antimicrobial herbal enzymes and organic matcha green tea. *Scientifica (Cairo).* 2016;2016:2183623. <https://doi.org/10.1155/2016/2183623>
13. Stephen AS, Nicolas CS, Lloret F, Allaker RP. In vitro effectiveness of pomegranate extract present in pet oral hygiene products against canine oral bacterial species. *Vet World.* 2022;15(7):1714-1718. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.1714-1718>
14. Rawlings JM, Gorrel C, Markwell PJ. Effect on canine oral health of adding chlorhexidine to a dental hygiene chew. *J Vet Dent.* 1998;15(3):129-134. <https://doi.org/10.1177/089875649801500303>
15. Chavarría-Bolaños D, Esparza-Villalpando V, Ramírez K. Antibacterial and Antifungal Capacity of Three Commercially Available Mouthwashes with Different Concentrations of Chlorhexidine. *Odovtos-Int J Dent Sc.* 2022;24(2):69-80. <https://doi.org/10.15517/ijds.2021.48079>
16. Bauer AW, Kirby W, Sherris J, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol.* 1966;45(4):493-496. https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493
17. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019.
18. Glickman L, Glickman N, Moore G, Lund E, Lantz G, Pressler B. Association between chronic azotemic kidney disease and the severity of periodontal disease in dogs. *Prev Vet Med.* 2011;99(2-4):193-200. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.01.011>
19. Oliveira M, Tavares M, Gomes D, Touret T, São Braz B, Tavares L, et al. Virulence traits and antibiotic resistance among enterococci isolated from dogs with periodontal disease. *Comp Immunol Microb.* 2016;46:27-31. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.04.002>

20. Van Strydonck DA, Timmerman MF, Van der Velden U, Van der Weijden GA. Plaque inhibition of two commercially available chlorhexidine mouthrinses. *J Clin Periodontol.* 2005;32(3):305-309. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00681.x>
21. Van Strydonck DA, Slot DE, Van der Velden U, Van der Weijden F. Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2012;39(11):1042-1055. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2012.01883.x>
22. Ronanki S, Kulkarni S, Hemalatha R, Kumar M, Reddy P. Efficacy of commercially available chlorhexidine mouthrinses against specific oral microflora. *Indian J Dent Res.* 2016;27(1):48-53.
23. Kling KE, Maddox CW, Manfra Marretta S, Nowicki C, Schaeffer DJ. Effect of TrisEDTA and Chlorhexidine 0.12% on an *in vitro*-defined biofilm representing the subgingival plaque biofilm of the dog. *J Vet Dent.* 2022;39(1):9-20. <https://doi.org/10.1177/08987564211058496>
24. Garanayak N, Das M, Patra RC, Biswal S, Panda SK. Effect of age on dental plaque deposition and its control by ultrasonic scaling, dental hygiene chew, and chlorhexidine (0.2%w/v) in dogs. *Vet World.* 2019;12(11):1872-1876. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1872-1876>
25. Malic S, Emanuel C, Lewis MAO, Williams DW. Antimicrobial activity of novel mouthrinses against planktonic cells and biofilms of pathogenic microorganisms. *Microbiol Discov.* 2013;1:11. <https://doi.org/10.7243/2052-6180-1-11>
26. Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med Chem.* 2015;7(4):493-512. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.6>
27. Singh S, Singh SK, Chowdhury I, Singh R. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *Open Microbiol J.* 2017;11:53-62. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010053>
28. Li Y, Xiao P, Wang Y, Hao Y. Mechanisms and control measures of mature biofilm resistance to antimicrobial agents in the clinical context. *ACS Omega.* 2020;5(36):22684-22690. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02294>
29. Chandki R, Banthia P, Banthia R. Biofilms: A microbial home. *J Indian Soc Periodontol.* 2011;15(2):111-114. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.84377>