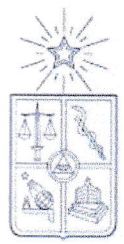


M  
B826e  
2019  
C-1



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
ESCUELA DE GRADUADOS  
MAGISTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS  
MENCIÓN PERIODONTOLOGÍA**

**EFFECTO CLÍNICO Y MICROBIOLÓGICO EN ADOLESCENTES Y ADULTOS  
JÓVENES CON GINGIVITIS TRATADOS CON *LACTOBACILLUS*  
*RHAMNOSUS* ADJUNTO A LA TERAPIA PERIODONTAL CONVENCIONAL**

Joel Enrique Bravo Bown

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE  
MAGÍSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS



110323

TUTOR PRINCIPAL  
Prof. Dr. Jorge Gamonal Aravena

TUTORES ASOCIADOS:  
Prof. Dra. Claudia Lefimil Puente

Santiago – Chile  
2019

110323

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
ESCUELA DE GRADUADOS

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER EN CIENCIAS  
ODONTOLÓGICAS MENCIÓN PERIODONTOLOGÍA**

Se informa al Consejo de Posgrado de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, que la Tesis de Magister en Ciencias Odontológicas presentada por el candidato

**JOEL ENRIQUE BRAVO BOWN**

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Odontológicas, mención Periodontología en examen rendido el 24 de junio del 2019.

**COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS**



Prof. Dr. Gonzalo Rodríguez M.



Prof. Dr. Mauricio Baeza P.



Prof. Dra. Nora Silva S.



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
ESCUELA DE GRADUADOS  
MAGISTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS  
MENCIÓN PERIODONTOLOGÍA**

**EFFECTO CLÍNICO Y MICROBIOLÓGICO EN ADOLESCENTES Y ADULTOS  
JÓVENES CON GINGIVITIS TRATADOS CON *LACTOBACILLUS*  
*RHAMNOSUS* ADJUNTO A LA TERAPIA PERIODONTAL CONVENCIONAL**

Joel Enrique Bravo Bown

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE  
MAGÍSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Jorge Gamonal Aravena

TUTORES ASOCIADOS:

Prof. Dra. Claudia Lefimil Puente

Santiago – Chile

2019

## **AGRADECIMIENTOS**

A través de la presente deseo agradecer en forma muy especial a mi Tutor de Tesis, Jorge Gamonal quien siempre durante todos mis años de formación y durante el desarrollo del presente trabajo de investigación me brindo su apoyo, ayuda y consejos para poder sacar adelante este y otros proyectos. De igual forma a Claudia Lefimil quien con paciencia y dedicación estuvo junto a mí en los procedimientos de Laboratorio ayudándome en cada uno de los pasos, siempre con optimismo para así poder aprender en un área en el que francamente me sentía muy limitado.

A los revisores de este trabajo, Nora Silva, Gonzalo Rodríguez y Mauricio Baeza sin los cuales el resultado del mismo no podría haber alcanzado el mérito y acabado suficiente.

A Carolina Galaz, Carolina Ferrer, Carol Ferrada mis más grandes agradecimientos por toda su ayuda en el proceso, brindándome apoyo hasta en los últimos momentos. Y a todos los que en forma directa e indirecta cooperaron y me ayudaron a cumplir con esta tarea.

Es frecuente escuchar la siguiente frase "Las personas pasan pero las Instituciones quedan", no obstante lo anterior, las Instituciones están formadas por personas, y son precisamente ellas las que le dan su valor. En la Universidad de Chile he conocido a grandes personas, gracias a todos.

## ÍNDICE

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINAS</b>
I. INTRODUCCIÓN	2
II. ASPECTOS TEÓRICOS	4
Etiología de la Gingivitis	4
Probióticos y su uso en el Tratamiento de las Enfermedades Periodontales	13
Enfermedad Periodontal y uso de Probióticos: Revisiones Sistemáticas	20
Relevancia del Problema	23
III. HIPÓTESIS	24
IV. OBJETIVOS	25
Objetivo General	25
Objetivos Específicos	26
V. MATERIAL Y MÉTODOS	27
Universo	27
Muestra	28
Criterios de inclusión	29
Criterios de exclusión	29
Ingreso de sujetos al estudio	30
Descripción de la constitución del grupo Test y Control	30
Examen periodontal y toma de muestras	31
Tratamiento periodontal	33
Toma de muestras	33

Aleatorización y ocultamiento de la secuencia aleatoria	34
Seguimiento	34
Procesamiento en el Laboratorio	34
Obtención de ADN genómico	36
Obtención de ADN genómico total desde las muestras clínicas	37
Cuantificación de ADN	37
Reacción de amplificación de ADN por PCR	37
Electroforesis de ADN en geles de agarosa	39
PCR en tiempo real	40
Operacionalización de Variables	40
Consideraciones éticas	42
Confidencialidad	42
Métodos estadísticos	43
Conflictos de intereses	44
VI. RESULTADOS	45
Reclutamiento	45
Características Demográficas y Clínicas	46
Pérdidas de sujetos del estudio	48
Reacciones Adversas (RAM)	48
Comparación Intra- e Inter-grupos de variables clínicas	48
Resultados Microbiológicos	55
Curvas de Calibración PCR Cuantitativo	57
Cuantificación de <i>P. gingivalis</i> , <i>T. forsythia</i> y <i>A. actinomycetemcomitans</i> en las muestras clínicas en el tiempo basal	60



Cuantificación de <i>P. gingivalis</i> , <i>T. forsythia</i> y <i>A. actinomycetemcomitans</i> en las muestras clínicas a los 3 y 6 meses	61
VII. DISCUSIÓN	66
VIII. CONCLUSIONES	73
IX. SUGERENCIAS	74
X. RESUMEN	75
BIBLIOGRAFÍA	78
I. ANEXOS	90
Anexo N°1.	90
Anexo N°2	98
Anexo N°3	101

## I. INTRODUCCIÓN

La gingivitis inducida por placa microbiana es la enfermedad periodontal más prevalente a nivel mundial, se caracteriza por la inflamación de los tejidos que rodean al diente sin producir pérdida de inserción periodontal (Albandar, 2002). Es causada por la acumulación de bacterias a nivel del margen gingival, aunque la composición de la microbiota asociada con la gingivitis difiere de aquella encontrada en los pacientes sanos, no hay bacterias específicas que sean patognomónicas de la enfermedad (Socransky, Haffajee, Cugini, Smith, & Kent, 1998). No obstante lo anterior, existen diferencias cualitativas entre la placa bacteriana adyacente a sitios saludables versus sitios enfermos y entre la placa bacteriana supragingival y la subgingival (R. Teles, Teles, Frias-Lopez, Paster, & Haffajee, 2013). Ciertas especies bacterianas asociadas a la periodontitis como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Tannerella forsythia* se encuentran también presentes en pacientes con gingivitis, encontrándose en el biofilm microbiano desde temprana edad (S. M. Lee et al., 2005; Morinushi, Lopatin, Van Poperin, & Ueda, 2000; Müller, Heinecke, Zöller, Fuhrmann, & Eger, 2001; Tanner, Maiden, Macuch, Murray, & Kent, 1998).

Las medidas preventivas y/o terapéuticas que permitan facilitar o mejorar su control son por lo tanto importantes, mucho más si se considera que la gingivitis y la periodontitis son consideradas parte de un proceso inflamatorio continuo (Sanz et al., 2015).

El tratamiento de la gingivitis se ha basado en la implementación de medidas de control de placa microbiana, ejecutadas por los pacientes y el profesional (Chapple et al., 2015). La terapia periodontal convencional logra disminuir de manera importante la carga microbiana, sin embargo, esto puede ser solo temporal ya que, las bacterias pueden recolonizar los nichos tratados en la cavidad oral (Goodson, Tanner, McArdle, Dix, & Watanabe, 1991; Tennert et al., 2014). En este contexto, es que ha emergido como una nueva estrategia de tratamiento complementaria el uso de probióticos, los que poseerían propiedades antibacterianas, antiinflamatorias e inmunomoduladoras (Teughels, Loozen, & Quirynen, 2011).

Los probióticos son microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del hospedero (OMS, 2006). *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) está dentro de las especies probióticas más estudiadas, existiendo estudios *in vitro*, que demuestran un

fuerte efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) en placas de agar (Teanpaisan, Piwat, & Dahlén, 2011). Inhibiría además la acción de las enzimas glicosiltransferasas impidiendo la síntesis de glucanos en la formación de la biopelícula microbiana (Meurman, 2005).

Como no existen estudios que determinen el efecto clínico y microbiológico de *L. rhamnosus* como coadyuvante en el tratamiento convencional de la gingivitis y dado que en adolescentes y adultos jóvenes se presenta una menor prevalencia de periodontitis el propósito del presente estudio es determinar las diferencias clínicas y microbiológicas en adolescentes y adultos-jóvenes con gingivitis al ser tratados con probiótico adjunto a la terapia convencional.

## ASPECTOS TEÓRICOS

### **Etiología de la Gingivitis**

La gingivitis inducida por placa microbiana es una de las enfermedades periodontales más frecuentes y afecta a poblaciones dentadas de cualquier edad (Eke et al., 2012). Los estudios de prevalencia en Chile han informado que comienza a temprana edad, a los 2 años se reportó un 32,6%, a los 4 años un



45%, a los 6 años un 55,1% y a los 12 años de edad un 66,9% (Soto & Jara, 2009; Soto & Tapia, 2007). Los estudios de prevalencia a nivel mundial indican que es la enfermedad periodontal más prevalente, aumenta con la edad y habitualmente es más afectado el sexo masculino (Elías-Boneta et al., 2017; Idrees, Azzeghaiby, Hammad, & Kujan, 2014; Igic et al., 2012; Li et al., 2010; Mostafa & El-Refai, 2018; Sreenivasan, Prasad, & Javali, 2016).

Comienza en el margen gingival y puede continuar afectando a los demás tejidos del periodonto. Entre los cambios histopatológicos se produce una proliferación del epitelio de unión a nivel del estrato basal, produciendo la migración celular lateral y apical, vasculitis de los vasos sanguíneos adyacentes al epitelio de unión, progresiva destrucción de la red de fibras colágenas, con cambio en los tipos de colágeno, alteración citopatológica de los fibroblastos residentes y un progresivo infiltrado celular inflamatorio (Armitage, 1995; Page & Schroeder, 1976).

Se caracteriza clínicamente por presentar agrandamiento del contorno gingival debido a edema, o fibrosis, cambio de color a rojo o rojo azulado (Polson & Goodson, 1985), aumento en la temperatura del surco gingival, sangrado al sondaje y elevación en la cantidad de fluido gingival crevicular (Armitage, 1995).

Aunque la composición de la microbiota asociada con la gingivitis inducida por placa microbiana difiere de aquella encontrada en los pacientes sanos, no hay bacterias específicas que sean patognomónicas de la enfermedad (Socransky et al., 1998). No obstante lo anterior, existen diferencias cualitativas entre la placa bacteriana adyacente a sitios saludables versus sitios enfermos y entre la placa bacteriana supragingival y la subgingival (R. Teles et al., 2013). Los sitios saludables son asociados con microbiota Gram positivo, con una representación importante de *Streptococcus* spp. y *Actinomyces* spp. (R. P. Teles, Haffajee, & Socransky, 2006). La microbiota adyacente a los sitios enfermos tiene una más alta cantidad de bacilos Gram negativo y formas móviles incluyendo *espiroquetas*, *Fusobacterium nucleatum* y *Bacteroides* (Berezow, Berezow, Darveau, & Darveau, 2010).

La biopelícula o placa dental que se desarrolla en el surco gingival se encuentra influida por la secreción de fluido gingival crevicular. Socransky y cols (1998), propusieron una clasificación de los consorcios bacterianos en esta zona, con un código de colores. El complejo amarillo está constituido por los colonizadores pioneros, anaerobios facultativos y fermentadores, en su mayoría *Streptococcus* spp. (*S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. gordonii*). Asociado a este

complejo, mediante coagregación, se encuentra el complejo azul, constituido por especies del género *Actinomyces*. El complejo púrpura comprendería las especies *Actinomyces odontolyticus* y *Veillonella párvula*, colonizadores secundarios que se asocian a la biopelícula cuando disminuye el oxígeno presente. El complejo verde está compuesto de microorganismos anaerobios como *Capnocytophaga* spp., *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, todos característicos de biopelículas maduras. El complejo naranja se caracteriza por la presencia de *Fusobacterium* (*F. nucleatum* y *F. periodonticum*), *Prevotella* (*P. intermedia*, *P. nigrescens*) y *Peptostreptococcus micros*, que hacen de puente entre las comunidades pioneras (complejos amarillo, azul, púrpura y verde) y microorganismos patógenos. Asociados al complejo naranja se encuentran otras especies características de la placa subgingival como *Synergistes*, *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis* y *Streptococcus constellatus*. Es frecuente la aparición de agrupaciones bacterianas en forma de "mazorca" o "escobilla". Finalmente, el complejo rojo está constituido por tres microorganismos anaerobios: *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola*, los cuales se encuentran enriquecidos en periodontitis, presentan capacidad de invasión de la mucosa y



se relacionan con la respuesta inflamatoria que se produce en esta patología (Socransky et al., 1998).

En los estudios de gingivitis experimental todos los participantes desarrollan algún grado de inflamación gingival en respuesta al acúmulo de placa microbiana, sin embargo la susceptibilidad a la gingivitis varía considerablemente entre los participantes (Tatakis & Trombelli, 2004). Las especies de *Actinomyces* y *Streptococcus* predominan en la placa supragingival y subgingival junto a un aumento de las bacterias Gram negativo subgingivales *F. nucleatum*, *V. párvula* y especies de *Treponemas* (Haffajee, Teles, & Socransky, 2006). De acuerdo a Moore (1987), la especie *Actinomyces catalasa* positivo (usualmente *A. viscosus II* y *Actinomyces NV*) aumentan cerca de dos veces su cantidad en los pacientes que presentan gingivitis versus pacientes sanos (Moore et al., 2016). De acuerdo a Teles (2013), entre las especies que más se asocian a la presencia de gingivitis se encuentran las especies de *Actinomyces*, *V. párvula* (complejo púrpura), *C. gingivalis*, *C. ochracea*, *C. sputigena* (complejo verde), *C. rectus*, *C. showae*, *F. nucleatum*, *P. nigresens*, entre otras (R. Teles et al., 2013).



De acuerdo a Kistler (2013), al utilizar métodos independientes de cultivos microbiológicos (pirosecuenciación plataforma 454), entre las especies más asociadas con gingivitis se encuentra al *Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum*, *Lachnospiraceae spp*, *Lautropia spp*, y *Prevotella oulorum* (Kistler, Booth, Bradshaw, & Wade, 2013). Huang (2011), utilizando la misma técnica encontró que los géneros más asociados a la enfermedad fueron *TM7*, *Leptotrichia*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Lautropia*, *Haemophilus*, *Streptococcus* y *Fusobacterium* (Huang et al., 2011).

De acuerdo a Socransky y Haffajee (2002), entre los colonizadores primarios en la formación de la placa microbiana se encuentran predominantemente bacterias pertenecientes a los complejos azul, amarillo, verde y púrpura, entre ellos las especies de *Actinomyces* destacan en abundancia (Socransky & Haffajee, 2002).

Ciertas especies bacterianas asociadas a la periodontitis como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Tannerella forsythia* se encuentran también presentes en pacientes con gingivitis, encontrándose en el biofilm microbiano desde temprana edad (S. M. Lee et al., 2005; Morinushi et al., 2000; Müller et al., 2001; Tanner et al., 1998). *Porphyromonas gingivalis* es

un bacilo corto, pleomórfico, Gram (-), anaeróbico, sin embargo puede sobrevivir por un corto periodo de tiempo expuesto al aire. Posee una gran cantidad de factores de virulencia, entre ellos, fimbrias, colagenasa, LPS, endotoxinas, una enzima parecida a tripsina (TLE), keratinasa, hemolisinas, fibrinolisin, hialuronidasa, fosfatasa ácida y alcalina, cápsula y otras proteasas tóxicas (Davey, 2006; Kadowaki et al., 2000). *Tannerella forsythia* es un anaerobio estricto, de forma bacilar con puntas ahusadas (fusiformes), entre los factores que facilitan su colonización se encuentra su capacidad de adhesión a otras células, a componentes sanguíneos y de la matriz extracelular, la que estaría relacionada con la capa S de la cápsula (Holt & Ebersole, 2005) y con una proteína de superficie (proteína BspA) (O'Brien-Simpson, Veith, Dashper, & Reynolds, 2004). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* es un bacilo Gram (-), microaerófilico, con formas cocoides que quedan en los extremos, inmóviles. Posee multitud de componentes y sustancias que lo hacen especialmente patógeno, pudiendo dañar y alterar el equilibrio del huésped. Es capaz de adherirse a células, a bacterias, a componentes de la matriz extracelular y a la saliva, mediante fimbrias, pili PilA, lipopolisacárido, proteínas de la membrana externa (proteínas EmaA) y Aae, el polímero extracelular PGA y vesículas (Fine, Kaplan, Kachlany, & Schreiner, 2006). Estos microorganismos han demostrado tener capacidad para colonizar nichos

periodontales, permanecer en estos mediante diversos mecanismos como la competencia con otras bacterias, mejor aprovechamiento de los nutrientes, evasión de las defensas del huésped, invasión de los tejidos del huésped y producir daño tisular directo (Serrano, Sanz, Iniesta, & Herrera, 2008).

Las enfermedades periodontales en la actualidad son consideradas enfermedades crónicas no transmisibles (Morales, Bravo, Baeza, Werlinger, & Gamonal, 2016), su etiología se encuentra relacionada con una disbiosis del sistema (Hajishengallis, Darveau, & Curtis, 2012), donde la microbiota que habitualmente se encuentra en un estado de simbiosis con el hospedero, sufre cambios que altera el balance ecológico y la homeostasis del sistema, transformándola en una microbiota disbiótica (Sebastián Domingo & Sánchez Sánchez, 2018). Se entiende por disbiosis a la pérdida de equilibrio entre las células de un organismo humano y las células bacterianas (microbianas en general) que lo habitan (Korecka & Arulampalam, 2012).

El tratamiento de la enfermedad se basa en crear e implementar un programa de control de placa microbiana (instrucción de higiene oral) y el debridamiento de las superficies (destartraje supragingival y pulido coronario) (Sculean et al., 2004), además de la eliminación de factores modificadores locales.



Normalmente para ello se utilizan instrumentos mecánicos, sónicos y ultrasónicos (Drisko et al., 2000; Heitz-Mayfield & Lang, 2013). Con estas acciones se busca disminuir la carga microbiana con el fin de restablecer la salud periodontal. El tratamiento y control de la gingivitis es un tema muy relevante ya que es considerada como un requisito para el subsecuente desarrollo de la periodontitis (Tonetti, Chapple, Jepsen, & Sanz, 2015). Lamentablemente después de la terapia se ha comprobado que las bacterias pueden recolonizar los sitios periodontales en un corto plazo (Goodson et al., 1991; Tennert et al., 2014).

En este contexto, es que ha emergido como una nueva estrategia de tratamiento complementaria, el uso de probióticos, los que poseerían propiedades antibacterianas, antiinflamatorias e inmunomoduladoras (Teughels et al., 2011).



## **Probióticos y su uso en el Tratamiento de las Enfermedades Periodontales**

Hipócrates (460 a.C - 377 a.C), el médico griego considerado como el creador de la verdadera Medicina, decía: "Haz que tus alimentos sean tus medicinas y que tus medicinas sean tus alimentos". Élie Metchnikoff (1845-1916) fue un zoólogo y microbiólogo ruso, Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1908, en la última década de su vida fijó su atención en una población de Bulgaria donde existía un increíble número de personas ancianas (centenarias) a pesar de ser uno de los países más pobres. Detectó que las personas de Bulgaria consumían grandes cantidades de yogurt que contenían bacterias fermentantes lácticas. Metchnikoff logró aislar la bacteria responsable de la producción del yogurt y la utilizó para sus investigaciones cimentando los inicios de la probiótica. Metchnikoff se volvió un firme defensor del concepto que la dieta puede proteger el cuerpo de la invasión de patógenos y en consecuencia mejorar y prolongar la vida. Fue la primera persona en desarrollar un preparado terapéutico utilizando *Lactobacillus* spp. en forma de cápsula para ingerir oralmente denominado *Lactobacillin*.

En 1965, Lilly y Stillwell utilizaron por primera vez el término probiótico, para nombrar a los productos de la fermentación gástrica. Esta palabra se deriva de

los vocablos, del latín “pro” que significa por o a favor de, y del griego “bios” que significa vida (Lilly & Stillwell, 1965).

En el 1989, R. Fuller definió a los probióticos como: “aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino” (Fuller, 1989).

En el año 1998 el "ILSI" (International Life Science Institute) definió a los probióticos como: “microorganismos vivos, que cuando son ingeridos en cantidades suficientes, tienen efectos beneficiosos para la salud, lo que va más allá de los efectos nutricionales convencionales, afectan beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, proporcionan un mejor estado de salud y bienestar y/o reducen el riesgo de enfermar. Pueden ser funcionales para la población general o para grupos particulares de la misma (Roberfroid, 2000).

El término probiótico fue adoptado en el 2003, microorganismos vivos que cuando son administrados en una cantidad adecuada le otorgan beneficios a los pacientes. Científicos japoneses han observado que microorganismos inactivados o sus componentes celulares pueden también ejercer efectos

benéficos sobre la salud humana, tales resultados han ampliado el concepto de probióticos, eliminando el hecho de que los microorganismos tengan que estar vivos en su administración (Meurman, 2005).

En las aplicaciones gastrointestinales ha sido recomendado que los probióticos sean combinados con prebióticos. Las especies de probióticos pertenecen principalmente a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

Es esencial para los microorganismos el resistir las condiciones del medio ambiente oral y los mecanismos de defensa, deben ser capaces de adherirse a superficies cubiertas por saliva, colonizar y crecer en la boca y habitar con patógenos orales. Los probióticos en la salud oral han sido evaluados primariamente en el manejo de la caries dental (Ahola et al., 2002; Çaglar, Kavaloglu Cildir, Ergeneli, Sandalli, & Twetman, 2009; Rodríguez et al., 2016).

*Lactobacillus rhamnosus* GG fue aislada en 1983 del tracto gastrointestinal de un individuo sano; descrita por Gorbach y Goldin (de cuyas iniciales se originó su denominación) y patentada en 1985 (Gorbach, 1996). Esta cepa está registrada en la American Type Culture Collection (ATCC) con el número 53103. *Lactobacillus rhamnosus* GG fue clasificado originalmente como *L.*



*acidophilus*, posteriormente como *L. casei* y finalmente como *L. rhamnosus* cuando se describió la totalidad de su genoma (Brunser T, 2013). Goldin y colaboradores demostraron que *Lactobacillus rhamnosus* GG sobrevivía el paso a lo largo del tubo digestivo (Alander et al., 1999), persistía por cuatro días en las heces del 87% de los voluntarios que lo habían ingerido y era detectable en el 33% de ellos hasta los siete días (Majamaa, Isolauri, Saxelin, & Vesikari, 1995). Es uno de los probióticos más frecuentemente utilizados a la fecha, sin embargo, se ha reportado que es incapaz de establecerse como residente permanente en la cavidad oral (Segers & Lebeer, 2014). No obstante aquello, existe evidencia que sugiere que si el probiótico es consumido en forma regular, puede llegar a establecerse por periodos de tiempo prolongados y así lograr ejercer efectos mantenidos (Meurman, 2005; Yli-Knuuttila, Snäll, Kari, & Meurman, 2006).

Teughels y cols. (2007) describieron que la aplicación de bacterias benéficas en perros Beagle después de la terapia periodontal no quirúrgica, retardaba la recolonización de microorganismos patógenos y reducía la inflamación de los tejidos periodontales (Teughels et al., 2007). Estudios en humanos con periodontitis encontraron una reducción en el sangrado al sondaje, índice de placa e índice gingival después de la aplicación de probióticos (Meurman, 2005;



Yli-Knuuttila et al., 2006). Otros estudios no han encontrado efectos clínicos de los probióticos en la enfermedad periodontal (Iniesta et al., 2012; J.-K. Lee, Kim, Ko, Ouwehand, & Ma, 2015). La mayoría de estos estudios han sido llevados a cabo en individuos con una biopelícula dental ya establecida, lo que hace difícil que las bacterias probióticas puedan incorporarse y modificarla (Socransky & Haffajee, 2002). Como es sabido, los antibióticos son más efectivos cuando la biopelícula ha sido desorganizada, de la misma forma sucedería con los probióticos.

Se han propuesto algunos mecanismos de acción de los probióticos a nivel oral, entre ellos es posible mencionar, interacciones directas en la biopelícula dental a través de acciones en la formación de ésta, en el metabolismo de sustratos y producción de sustancias antimicrobianas, así como acciones indirectas, pudiendo actuar como moduladores del sistema inmune, tener efecto sobre mecanismos de defensa no inmunológicos, en la regulación de la permeabilidad de las mucosas, y a través de la generación de una presión en el desarrollo de microbiota oral a través de la colonización de especies menos patogénicas (Saha, Tomaro-Duchesneau, Tabrizian, & Prakash, 2012).

A nivel periodontal se ha estudiado el efecto de los probióticos en la periodontitis con el objetivo de subsanar las limitaciones de la terapia no quirúrgica y el uso de antibióticos. Se reportó un mayor aumento en los niveles de inserción clínica y una mayor disminución de la profundidad de sondaje, índice gingival, índice de placa, índice de sangrado al sondaje y conteo de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. intermedia* en los pacientes a los que se le administró comprimidos de disolución oral de *Lactobacillus reuteri* en conjunto con el pulido coronario y radicular versus el placebo (Tekce et al., 2015). Resultados similares en la profundidad de sondaje, índice de placa y presencia de patógenos periodontales se reportó en pacientes fumadores con periodontitis crónica a los que se le administró comprimidos de disolución oral de *Lactobacillus salivarius* (Mayanagi et al., 2009). En el grupo que recibió comprimidos de disolución oral de *L. reuteri* sin pulido y alisado radicular, se presentó una mayor disminución de la profundidad al sondaje, índice de placa e índice de sangrado, versus el placebo (Vicario, Santos, Violant, Nart, & Giner, 2013). Además se observó una disminución del volumen del fluido gingival crevicular, TNF-  $\alpha$ , IL-6 e IL-8 en el grupo experimental de goma de mascar con *L. reuteri* al ser comparado con la medición basal (Twetman et al., 2009). En el grupo de *L. salivarius*, se observó una disminución en los niveles de lactoferrina salival en individuos fumadores al ser comparados con los del grupo control

(Shimauchi et al., 2008). No se reportaron efectos adversos en la administración de *L. reuteri* (Vicario et al., 2013) ni *L. salivarius* (Mayanagi et al., 2009). Además existe evidencia que la administración de probióticos tiene efectos en la respuesta inmune mediada por Th17 y Treg en enfermedades asociadas a su desbalance (Dar et al., 2018).

## **Enfermedad Periodontal y uso de Probióticos: Revisiones Sistemáticas**

Existen pocas revisiones sistemáticas sobre el tema, entre ellas es posible mencionar a Teughels (2011) quien señala que los probióticos tienen un efecto positivo al disminuir la microbiota patógena oral, y un efecto más limitado sobre los índices periodontales (Teughels et al., 2011).

Yanine y cols (2013), menciona que la efectividad de los probióticos en la prevención y tratamiento de las enfermedades periodontales es cuestionable ya que existe insuficiente nivel de evidencia que sustente el hecho que la ingesta sistemática de probióticos beneficie a los pacientes con enfermedad periodontal (Yanine et al., 2013).

Saha y cols (2012), menciona que una formulación específica de probióticos debería servir como una estrategia preventiva o de tratamiento de las enfermedades periodontales, entendiendo que el rol de la microbiota bucal es clave en el desarrollo de las enfermedades dentales. Sin embargo investigaciones que traten sobre la eficacia clínica, optimización de la dosis, mecanismos de acción y otros parámetros relacionados son aún insuficientes (Saha et al., 2012).



Meurman y cols (2005), menciona que los datos sobre el efecto de los probióticos en la cavidad oral son aún escasos. Dado que los problemas sobre la resistencia a los antibióticos sigue aumentando en la población el concepto de terapia probiótica es interesante y pertinente (Riccia et al., 2007).

Tonetti y cols (2011), en la publicación que resume el consenso del 7º Workshop Europeo de Periodontología concluye que los probióticos tienen el potencial de modificar, al menos en corto plazo la microbiota oral ya sea a través de interacciones microbiológicas directas o a través de la modulación del sistema inmune. Los beneficios clínicos aún no han sido demostrados (Tonetti & Chapple, 2011).

Los ensayos clínicos aleatorizados disponibles que tratan sobre el efecto de los probióticos sobre la enfermedad periodontal demuestran en general un efecto favorable de los mismos en la prevalencia y progresión de la enfermedad periodontal (Harini & Aneundi, 2010; Ierardo et al., 2010; Iniesta et al., 2012; Karuppaiah et al., 2013; Nadkerny, Ravishankar, Pramod, Agarwal, & Bhandari, 2015; Purunaik, Thippeswamy, & Chavan, 2014; Shimauchi et al., 2008; Slawik

et al., 2011; Staab, Eick, Knöfler, & Jentsch, 2009; Teughels et al., 2013; Toiviainen et al., 2015; Twetman et al., 2009).

### **Relevancia del Problema**

La determinación de los cambios clínicos y microbiológicos en los pacientes con gingivitis tratados con probióticos es relevante ya que permitirá conocer el real efecto de las bacterias benéficas en los pacientes que presentan esta patología. Cualquier terapia complementaria que se logre implementar y que logre controlar esta enfermedad con alta prevalencia en la población puede convertirse en una importante medida de salud pública. Los alcances del efecto de los probióticos en la promoción, prevención y/o tratamiento de las enfermedades periodontales puede dar luces sobre su posible aplicación en otras enfermedades de naturaleza inmunoinflamatoria similar.

## II. HIPÓTESIS

La aplicación del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* como adjunto en la terapia periodontal convencional en pacientes adolescentes y adultos-jóvenes con gingivitis produce una disminución en las características clínicas periodontales (Índice gingival, índice de placa microbiana, índice de sangrado al sondaje, profundidad de sondaje y nivel de inserción clínico) y menores cantidades de *P. gingivalis* (*Pg*), *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*) y *T. forsythia* (*Tf*).



### III. OBJETIVOS

#### **Objetivo General**

Evaluar el efecto del uso de *Lactobacillus rhamnosus* en los parámetros clínicos (índice de placa bacteriana, índice gingival, índice de sangrado al sondaje, profundidad de sondaje y nivel de inserción clínico) y recuento microbiano de *P. gingivalis* (*Pg*), *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*) y *T. forsythia* (*Tf*) en adolescentes y adultos-jóvenes con gingivitis tratados con terapia periodontal convencional versus terapia periodontal convencional y probiótico de *Lactobacillus rhamnosus* comparado con placebo.

### Objetivos Específicos

1. Determinar las características clínicas periodontales (índice de placa bacteriana, índice gingival, índice de sangrado, profundidad de sondaje y nivel de inserción clínico) en pacientes adolescentes y adultos jóvenes con gingivitis tratados con terapia periodontal convencional y adjunto de *Lactobacillus rhamnosus* o Placebo a los 0, 3 y 6 meses.
2. Determinar la cantidad de *P. gingivalis* (*Pg*), *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*), *T. forsythia* (*Tf*) en pacientes adolescentes y adultos jóvenes con gingivitis tratados con terapia periodontal convencional y adjunto de *Lactobacillus rhamnosus* o Placebo a los 0, 3 y 6 meses.
3. Comparar los parámetros clínicos y recuento microbiano a los tiempos 0,3 y 6 meses en grupo experimental y control.

#### IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayo clínico aleatorizado doble ciego (de diseño paralelo, aleatorizado, enmascarado y con control mediante placebo) que evaluó el efecto del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 (Sacco, S.R.L, Italia) como adjunto al tratamiento periodontal convencional de pacientes con gingivitis. Registro en Clinical Trials NCT02801773.

##### **Universo**

Se constituyó por adolescentes y adultos jóvenes que asistían a Pre-universitario, estudiantes de odontología o sujetos que asistían a Unidad de Diagnóstico y Admisión de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y que cumplieron con los criterios de inclusión. Sin diferencias de sexo o etnia.

### Muestra

El tamaño muestral (Camacho-Sandoval J, 2008) fue calculado considerando:

Diferencia ( $d$ )  $\geq 1$  % entre los grupos para cambios en el promedio del IG e IS.

Desviación estándar ( $S$ ) de 1 %.

$\alpha = 0,05$ .

Poder estadístico ( $1 - \beta$ ) = 80 %

$Z_{\alpha} = 1,960$

$Z_{\beta} = 0,842$

$S = 1$

$d = 1$

$$n = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 S^2}{d^2}$$

El tamaño de cada grupo fue de 15 individuos.

Al considerar pérdida de un 15 %, se ajustó el tamaño muestral:

$n = 15$

$$n_{\text{ajustado}} = n * (1/1-R)$$

$R = 0,15$

Luego de ser ajustado, el tamaño muestral de cada grupo fue de 18 individuos.



**Criterios de inclusión**

- 15 a 28 años de edad.
- Con diagnóstico de gingivitis (Índice gingival  $\geq 1,3$  en más del 10% de los sitios examinados).

**Criterios de exclusión**

- Pérdida de inserción interproximal  $>3$  mm en  $>2$  dientes no adyacentes (Tonetti, Claffey, European Workshop in Periodontology group C, 2005).
- Lesiones de caries y/o restauraciones defectuosas.
- En tratamiento odontológico de ortodoncia o periodontal.
- En tratamiento con planos de relajación oclusal.
- Presencia de alguna enfermedad o condición sistémica que genere alteraciones a nivel gingival.
- En tratamiento con antibióticos y/o antiinflamatorios o algún medicamento que interfiera con la respuesta gingival (mínimo 3 meses antes).
- Historia de hipersensibilidad o alergia a cualquier componente utilizado en el estudio.

## **Implementación del Ensayo Clínico**

### **Ingreso de sujetos al estudio**

Se invitó a participar del estudio a jóvenes que asistían a Preuniversitario Solidario "Germán Valenzuela Basterrica", que se imparte en Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y a estudiantes de Pregrado de la Universidad de Chile. Para ello se diseñaron folletos informativos que se pegaron en distintas ubicaciones en las dependencias de la Universidad y se realizó una charla explicativa a los estudiantes. Cuando los sujetos asistieron y establecieron contacto con los investigadores, se les explicó detalladamente en qué consistía el estudio. Todos firmaron consentimiento informado o asentimiento previamente validado por el Comité de ética científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Los padres/tutores de los menores de 18 años firmaron consentimiento informado.

### **Descripción de la constitución del grupo Test y Control**

Luego del reclutamiento, los individuos fueron asignados aleatoriamente al grupo Test (Experimental) o Control, considerando la edad y el sexo. Para ello se utilizó una tabla de números aleatorios.

Grupo Test (Experimental): Recibió un sobre con polvo de disolución oral, el que debió consumir 1 vez por día, por 3 meses, que contenía *L. rhamnosus* SP1 ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) (Sacco, S.R.L, Italia).

Grupo Control (Placebo): Recibió un sobre con polvo de disolución oral (placebo), el que debió consumir 1 vez por día, por 3 meses, que contenía almidón de baja humedad, y que tenía el mismo sabor, textura y apariencia que los sobres del grupo Test.

Todos los individuos debieron disolver el contenido del sachet en agua (200 ml), enjuagarse por 1 minuto y tomar el contenido en la noche antes de acostarse y después del cepillado nocturno.

### **Examen periodontal y toma de muestras**

A todos los participantes se les realizó un examen clínico periodontal, el cual fue realizado por un investigador previamente calibrado y que obtuvo una correlación intraclase promedio de 0.858 (Profundidad de sondaje: 0.866; Posición de encía 0.877; Nivel de inserción clínico 0.820; Índice de Placa 0.935; Índice de sangrado al sondaje 0.812; Índice gingival 0.842) (**Anexo 1**).

Los datos obtenidos fueron consignados en un formulario de evaluación clínica (**Anexo 2**). Se examinaron todos los dientes, excepto los terceros molares. Mediante el uso de una sonda periodontal manual de primera generación (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) se registraron los siguientes parámetros en seis sitios (mesiobucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual y mesiolingual) por diente:

- Índice gingival (IG)
- Índice de Placa (IP)
- Sangrado al Sondaje (SS)
- Profundidad de Sondaje (PS)
- Posición de la encía (PE)

El Nivel de Inserción Clínica (NIC) se calculó por la resta aritmética entre la PS y la PE medidas. Se aproximó la medición al milímetro superior. Los parámetros clínicos fueron consignados el día 0, a los 3 y 6 meses.

Durante todo el procedimiento, se respetaron las normas de bioseguridad necesarias para este tipo de intervenciones (material estéril, guantes desechables, mascarillas, toallas de papel, gasa, líquidos de desinfección y algodón).



### **Tratamiento periodontal**

Todos los participantes recibieron tratamiento periodontal no quirúrgico, se les enseñó la técnica de Bass modificada y a utilizar seda dental. El tratamiento periodontal, además de la instrucción de higiene oral, consistió en 2 o 3 sesiones de destartraje supragingival y pulido coronario. A todos los participantes del estudio se les entregó elementos de higiene oral, cepillo dental de cerdas suaves y seda dental.

### **Toma de muestras**

Se obtuvo una muestra de placa subgingival de cuatro sitios diagnosticados con gingivitis, uno de cada cuadrante, los que tenían un valor de índice gingival  $\geq$  a 1. Luego de aislar el área con tómulas de algodón, y secar suavemente con aire, los depósitos supragingivales fueron cuidadosamente removidos con curetas (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). Las muestras microbiológicas subgingivales fueron obtenidas mediante la inserción de dos puntas de papel n° 30 estandarizadas y estériles (Johnson & Johnson, Tokyo, Japan) en la parte más profunda del surco gingival por un tiempo de 20 segundos. Las muestras de cada participante fueron almacenadas en un vial con 1 mL de fluido de transporte prereducido (RTF) estéril sin EDTA, mantenido a 4° C, hasta su procesamiento a través de técnica de PCR en tiempo real. Las muestras fueron tomadas en ambos grupos en el tiempo basal y a los 3 y 6 meses.

### **Aleatorización y ocultamiento de la secuencia aleatoria**

Un segundo investigador mantuvo oculta la secuencia de asignación hasta el análisis de los datos cuando todas las variables clínicas y microbiológicas fueron recolectadas (JG). La revelación del tratamiento sólo fue admisible si el participante desarrolló un efecto adverso grave potencialmente asociado con la intervención.

### **Seguimiento**

Se contactó telefónicamente a los participantes todas las semanas, para preguntar por efectos adversos y conocer si se estaban siguiendo las indicaciones. Se entregaban 30 sachet cada 30 días, hasta completar el periodo de intervención. Además se solicitaba a los participantes que al momento de asistir a buscar los probióticos/placebos del segundo y tercer mes de tratamiento, devolviesen los sobres sin utilizar y los que se encontraban vacíos. En cada una de las visitas, el tratante, les realizó preguntas sobre el cumplimiento y efectos.

### **Procesamiento en el Laboratorio**

Se realizó el procesamiento de las muestras de placa subgingival, contenidos en medio RTF, para su análisis por PCR cuantitativo. Las curvas estándar se construyeron a partir de las cepas ATCC 33277 (*Porphyromonas gingivalis*),

ATCC 43037 (*Tannerella forsythia*), ATCC 29522 (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*).

El cultivo de la cepa de *P. gingivalis* ATCC 33277 se realizó en medio Agar sangre- Hemina-Menadiona, conteniendo 3% de Agar trypticase (Becton Dickinson), 0,5% p/v extracto de levadura (Becton Dickinson), 0,000005 % p/v de Hemina (Sigma®), 0,000001% p/v de Menadiona (Sigma®) y 5% v/v de sheep's blood (ThermoFisher Scientific™). Las placas fueron incubadas anaeróticamente a 35°C por 7 a 14 días en jarras herméticas con generadores de anaerobiosis (Anaerogen Oxoid®).

El cultivo de la cepa de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29522 se realizó en placas de 3,8% p/v de medio selectivo TSBV (40% p/v agar Trypticase (Becton Dickinson), 1% p/v extracto de levadura (Becton Dickinson), 10% v/v suero de caballo (ThermoFisher Scientific™), 0,005 % p/v bacitracina y 0,075% p/v vancomicina). Las placas fueron incubadas a 37°C por 2 a 3 días en medio capnofílico.

El cultivo de la cepa de *Tannerella forsythia* se realizó en placas de 3,8% p/v de Heart infusion broth (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), 0,005% p/v de ácido

N-acetilmurámico (Sigma®), 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Menadiona (Sigma®), 5% v/v suero fetal bovino, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Hemina (Sigma®), 5% p/v extracto de levadura (Becton Dickinson) y agar 2% p/v (Becton Dickinson). Las placas fueron incubadas anaeróticamente a 35°C por 7 a 14 días en jarras herméticas con generadores de anaerobiosis (Anaerogen Oxoid®).

### **Obtención de ADN genómico**

Para la purificación de ADN genómico de las cepas de referencia, se utilizó el Wizard® Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA) siguiendo las recomendaciones del fabricante con algunas modificaciones. Las células se colectaron por centrifugación 10 min a 8.000 x *g* a 4°C.

Los pasos siguientes fueron fidedignos al protocolo indicado por el proveedor de Wizard® Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA), respetando las proporciones de volúmenes de las diferentes soluciones. Finalmente, el ADN se resuspendió en 1 mL de "DNA rehydratation solution" y se incubó 1 hora a 65°C para facilitar su rehidratación y luego toda la noche a 4°C. La integridad del ADN genómico purificado se analizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa, como se indica más adelante.



### **Obtención de ADN genómico total desde las muestras clínicas**

Para la purificación de ADN genómico total desde las muestras clínicas de placa subgingival en RTF se utilizó el Kit DNeasy blood and tissue (Qiagen®). Las células se colectaron por centrifugación 5 min a  $7.500 \times g$  por 5 min. El sedimento bacteriano se resuspendió en  $180 \mu\text{L}$  de buffer de lisis enzimático, incubando a  $37^\circ\text{C}$  por 30 min. Se siguió todas las recomendaciones del proveedor hasta que en los pasos finales se agregó  $200 \mu\text{L}$  de buffer de elusión AE, incubando a temperatura ambiente por 1 minuto, para luego centrifugar por 1 minuto a  $8.000 g$ .

### **Cuantificación de ADN**

La cuantificación de los ácidos nucleicos purificados desde las cepas de referencia y a partir de las muestras de placa subgingival, se realizó por medición de la absorbancia a  $260 \text{ nm}$  en un equipo lector de placas SYNERGY HT (Marca Biotek, modelo, Synergy HT, serie 1405181). Posteriormente se diluyó cada una de las muestras a una concentración final de  $5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ .

### **Reacción de amplificación de ADN por PCR**

Se comprobó mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) los oligonucleótidos que serían utilizados luego para PCR cuantitativo (en tiempo

real), junto con el ADN genómico purificado de las cepas de referencia. Todas las reacciones de amplificación por PCR se efectuaron utilizando la DreamTaq DNA polimerasa (Thermo®) y las siguientes condiciones de reacción: Una etapa de desnaturalización inicial de 2 min a 94°C seguida de 30 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94°C por 20 s, apareamiento del oligonucleótido a 60°C por 20 s y elongación a 72 °C por 20 s) y un ciclo final de 10 min de elongación a 72 °C. La reacción se realizó utilizando 1 µM de cada oligonucleótido, 0,2 mM de mezcla de dNTPs (Thermo Scientific®), 0,05 U/µL de DreamTaq ADN polimerasa (Thermo Scientific®), y 1x de tampón de PCR que contiene 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>. Se utilizó 3 µL de ADN molde. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa, tal como se indica más adelante.

Todos los oligonucleótidos utilizados en esta tesis se obtuvieron de Integrated DNA Technologies (IDT) y se muestran en la **Tabla I**.

**Tabla I.** Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Espece	Oligonucleótidos*	Referencia
<i>P. gingivalis</i>	F: 5' – TGT AGA TGA CTG ATG GTG AAA ACC– 3' R: 5' – ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC – 3'	Tran and Rudney, 1999 (Tran & Rudney, 1999)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	F: 5' – ATT GGG GTT TAG CCC TGG TG – 3' R: 5' – ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC – 3'	Tran and Rudney, 1999 (Tran & Rudney, 1999)
<i>T. forsythia</i>	F: 5' – GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA – 3' R: 5' – TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T – 3'	Carrouel y cols, 2016 (Carrouel, Viennot, Santamaria, Veber, & Bourgeois, 2016)
<i>L. rhamnosus</i>	F: 5' – TGC TTG CAT CTT GAT TTA ATT TTG – 3' R: 5' – GGT TCT TGG ATY TAT GCG GTA TTA G – 3'	Byun y cols., 2004 (Byun et al., 2004)

\* F : Forward o directo, R : Reverse o reverso. Y = nucleótidos C ó T

### Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Las muestras de ADN (genómico o productos de PCR) se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% usando tampón TAE 1x (Tris-acetato 40 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, pH 8,3) que contenía Safeview NBS Biologicals Ltda. que permite la visualización de ácidos nucleicos con luz ultravioleta. La electroforesis se realizó a 80-100 V por tiempos variables en amortiguador TAE 1x y los ácidos nucleicos se visualizaron en un transiluminador de radiación UV. Los geles fueron fotografiados y la imagen procesada mediante el sistema Carestream.

### **PCR en tiempo real**

Se utilizó el método de la curva estándar (Livak & Schmittgen, 2001) para la cuantificación de los diferentes microorganismos analizados. Para este fin, se utilizó DNA genómico, purificado de las cepas de referencia, como molde en el PCR para generar una curva estándar para cada microorganismo en estudio. La eficiencia de cada pareja de primarios se determinó a partir de la gráfica de la curva estándar mediante la ecuación:  $\text{Eficiencia} = (10^{(-1/\text{pendiente recta}) - 1}) * 100$ .

Para la curva estándar se preparó una dilución seriada donde el ADN genómico bacteriano se encontró a las concentraciones de 1 ng/uL, 0,1 ng/uL, 0,01 ng/uL, 0,001 ng/uL y 0,0001 ng/uL. Cada reacción de PCR contenía 10 µL de SYBR Green Supermix, 0,2 mM final de cada oligonucleótido y 10-40 ng de ADN purificado de placa microbiana subgingival en un volumen final de 20 µL. Para la amplificación del DNA se empleó el siguiente perfil térmico: 95°C por 3 min, seguido de 40 ciclos con pasos de 95°C, 60°C y 72°C por 30 s cada uno. Se confirmó la generación de productos específicos mediante el análisis de curvas de denaturación del producto de PCR final. Se usó agua como control negativo.

### **Operacionalización de Variables**

En la **Tabla II** se presenta el cuadro de operacionalización de las variables clínicas y microbiológicas a estudiar.



**Tabla II. Operacionalización de Variables**

Variable	Tipo de Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Codificación	Índice
<b>Índice Gingival (IG)</b>	Catagórica Ordinal	Presencia de características inflamatorias de margen gingival	Promedio de sitios con características clínicas inflamatorias. Se utiliza una sonda periodontal, introducida en el tercio coronario del surco gingival (aprox. 0.5 mm).	0: encía normal, no hay inflamación, ni cambio de color o sangrado. 1: Leve inflamación y alteración de la superficie gingival, no hay sangrado. 2: Inflamación moderada, eritema y edema. Sangrado al sondaje o bajo el efecto de la presión. 3: Inflamación severa, eritema de importancia y edema. Tendencia al sangrado espontáneo, ulceración)	IG promedio = IG por grupo dentario/6
<b>Índice de Placa Microbiana (IP)</b>	Dicotómica Nominal	Presencia de colorante (Placa microbiana) adyacente al margen gingival	Porcentaje de sitios con presencia de placa microbiana en contacto con el margen gingival. Se utilizó una pastilla reveladora de la placa microbiana.	0: sitios sin presencia de colorante. 1: sitios con presencia de colorante	% IP = % de sitios con colorante en contacto con el margen gingival.
<b>Sangrado Al sondaje (IS)</b>	Dicotómica Nominal	Presencia de sangrado en el surco marginal después de realizar sondaje periodontal.	Porcentaje de sitios con sangrado gingival producido hasta 15 segundos después de la introducción de la sonda en el surco gingival.	0: sitios sin sangrado. 1: sitios con sangrado	IS (%) = $N^{\circ}$ sitios (+) / total de sitios examinados x 100.
<b>Profundidad de Sondaje (PS)</b>	Numérica Continua	Medición en mm. de la distancia entre el margen gingival y el fondo del sitio periodontal examinado	Promedio de la profundidad de sondaje periodontal.	No existe codificación. Dada la naturaleza de la variable se registra el valor en mm.	PS promedio = PS por grupo dentario/6
<b>Nivel de Inserción Clínica (NIC)</b>	Numérica Continua	Medición en mm. de la distancia entre el LAC y el fondo del sitio periodontal examinado	Promedio del nivel de inserción clínica periodontal	No existe codificación. Dada la naturaleza de la variable se registra el valor en mm.	NIC promedio = NIC por grupo dentario/6
<b>Cuantificación de Pg, Aa, Tf y Av</b>	Numérica Continua	Detección con PCR Tiempo real	Cantidad de Pg, Aa, Tf y Av en las muestras clínicas.	No existe codificación. Dada la naturaleza de la variable se registra el valor en $\mu\text{g/dl}$	Cantidad de Pg, Aa, Tf y Av en las muestras clínicas.

### **Consideraciones éticas**

El protocolo fue revisado y aprobado por la Comisión de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Además, se rigió según el marco legal que regula a los Ensayos Clínicos en Chile, y en conformidad con la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en el año 2000.

A cada participante que cumplió con los criterios de inclusión, se le entregó un consentimiento y/o asentimiento informado que fue revisado, consentido y firmado por él (o su representante legal) para su aprobación e ingreso al estudio. A todos los participantes se les informó de su salud oral. Todos los participantes fueron instruidos en técnica de higiene oral y recibieron al menos dos sesiones de tratamiento periodontal.

### **Confidencialidad**

La confidencialidad de los pacientes fue respetada en todas las fases del proceso. Sólo el investigador principal conoció el nombre de los pacientes que fueron incluidos en el estudio. El Formulario de Registro Clínico utilizado para recoger los datos de las citas de seguimiento tuvo un elemento con el nombre

del paciente, pero cuando se introdujeron los datos de la base de datos el nombre fue cambiado por un código de identificación. Las copias del Formulario de Registro Clínico fueron revisados por el investigador principal o alguien autorizado por él sólo en casos específicos, como la evaluación de calidad de los datos o la comprobación de los datos erróneamente introducidos en las bases de datos. Fotos de los pacientes no se tomaron en ninguna de las fases del estudio.

### **Métodos estadísticos**

Para el análisis estadístico se utilizó el software STATA versión 11. Se utilizó el test de Shapiro Wilk para determinar la normalidad de las variables cuantitativas continuas. Las variables cuantitativas entre los grupos Test y Control se analizaron con el Test de ANOVA. Para comparar las características demográficas, se utilizó el test T de Student para las variables cuantitativas continuas con distribución normal, el test de U Mann-Whitney para las que no presenten distribución normal, y el test de  $\chi^2$  o test exacto de Fisher para las variables categóricas. Se consideró como estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$  y un intervalo de confianza de 95%.

**Conflictos de intereses**

El investigador principal y cualquiera de los otros investigadores no tienen conflicto de interés. Ninguna compañía farmacéutica u otra entidad recibió beneficios directos o indirectos.



## V. RESULTADOS

### Reclutamiento

Se realizó examen clínico a un total de 84 sujetos, 15 de ellos fueron excluidos por no cumplir con los criterios de inclusión y 9 por otras razones, entre ellos la falta de disponibilidad horaria, la lejanía geográfica de sus domicilios, el cambio de número de teléfono. Un total de 60 sujetos fueron aleatorizados, incorporando 30 al grupo Test y 30 al grupo Control (**Figura 1**).

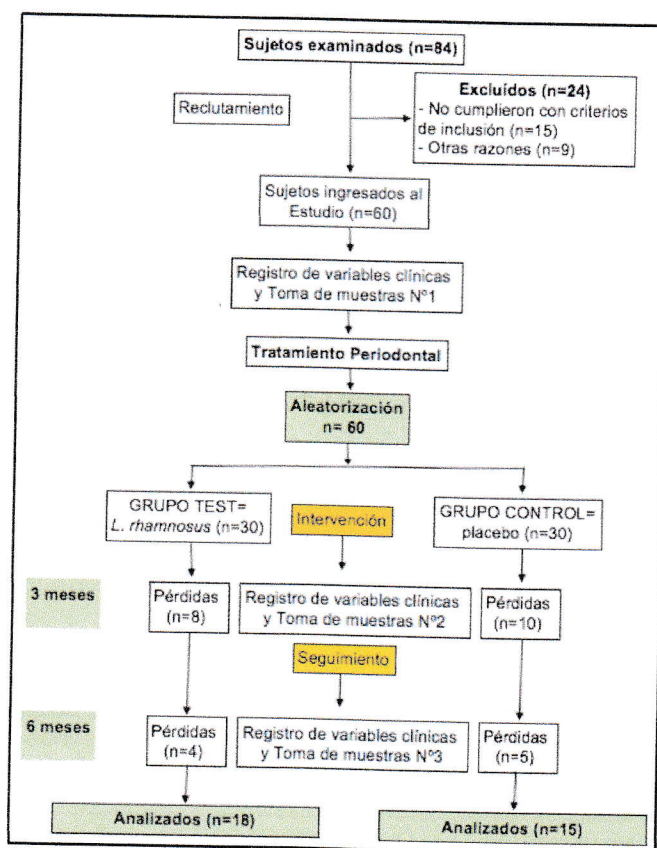


Figura 1. Diseño del estudio. Flujograma.

### Características Demográficas y Clínicas

Las características demográficas y clínicas en el tiempo basal son presentadas en la **Tabla III** y **Tabla IV** respectivamente. No se presentó diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) en el basal.

**Tabla III.** Características demográficas de los sujetos de estudio.

Variable	Grupos en Tratamiento		
	Test (n=30)	Control (n=30)	p- valor
Edad <sup>1</sup> (media ± DE) años	19,7 ± 2,05	19,3 ± 2,5	0,7077
Sexo (M/F) <sup>2</sup>	3/12	4/11	1,0000

DE: Desviación Estándar

<sup>1</sup>Test T de Student; <sup>2</sup>Test exacto de Fisher's

**Tabla IV.** Índice gingival (IG), Índice de placa bacteriana (IP), Índice de sangrado al sondaje (IS), Profundidad de sondaje (PS) expresados como promedios y desviación estándar (DE) en el examen clínico **basal**. Comparaciones inter-grupos con ANOVA ( $p < 0,05$ ).

VARIABLES	TEST (media ± DE)	CONTROL (media ± DE)	DIFERENCIAS (media ± DE)	p valor (inter-grupos)
IG	0,99 ± 0,19	0,85 ± 0,26	0,15 ± 0,07	0,0729
IP	32,77 ± 13,76	32,82 ± 11,83	0,05 ± 1,93	0,9918
IS	39,94 ± 10,85	40,78 ± 12,87	0,85 ± 2,02	0,8387
PS	2,07 ± 0,30	2,13 ± 0,14	0,07 ± 0,16	0,4388
NIC	2,01 ± 0,30	2,16 ± 0,20	0,14 ± 0,10	0,1232

### **Pérdidas de sujetos del estudio**

Un total de 27 sujetos abandonaron el estudio, 12 (40%) en el grupo Test y 15 (50%) en el grupo Control. Los motivos del alto porcentaje de pérdidas (mayor al 15%) fueron cambio de domicilio, cambio de número de teléfono, por motivos laborales, etc. Pudo detectarse en general, poco compromiso de los adolescentes con el estudio.

### **Reacciones Adversas (RAM)**

No se presentaron reacciones adversas en los grupos de estudio.

### **Comparación Intra- e Inter-grupos de variables clínicas**

Se presentan los valores de las variables clínicas analizadas separadas por grupo Test y Control, en los distintos tiempos de evaluación (**Tabla V**). En la comparación Intra-grupos fue posible detectar una disminución estadísticamente significativa en todas las variables clínicas analizadas en el grupo Test y Control. En la comparación Inter-grupos se detectó una mayor disminución en las variables clínicas analizadas en el grupo Test, sin presentar diferencias estadísticamente significativas.



**Tabla V.** Comparación Intra- e intergrupos de variables clínicas (promedio  $\pm$  DS)

	TEST (n=18)				CONTROL (n=15)			
	Basal	3 meses	6 meses	p	Basal	3 meses	6 meses	p
IG <sup>3</sup>	<b>0,99 <math>\pm</math> 0,19*</b>	<b>0,49 <math>\pm</math> 0,17*</b>	0,51 $\pm$ 0,32	<b>0,0000*</b>	<b>0,85 <math>\pm</math> 0,26*</b>	<b>0,60 <math>\pm</math> 0,26*</b>	0,58 $\pm$ 0,31	<b>0,0150*</b>
IP <sup>2</sup>	<b>32,7 <math>\pm</math> 13,7*</b>	<b>17,4 <math>\pm</math> 10,3*</b>	23,70 $\pm$ 10,9	<b>0,0006*</b>	<b>32,8 <math>\pm</math> 11,8*</b>	<b>22,0 <math>\pm</math> 10,5*</b>	29,4 $\pm$ 10,1	<b>0,0132*</b>
IS <sup>3</sup> (%)	<b>39,9 <math>\pm</math> 10,8*</b>	<b>22,3 <math>\pm</math> 10,9*</b>	22,8 $\pm$ 7,54	<b>0,0000*</b>	<b>40,8 <math>\pm</math> 12,9*</b>	<b>25,3 <math>\pm</math> 2,93*</b>	24,3 $\pm$ 2,77	<b>0,0007*</b>
PS <sup>3</sup> (mm)	<b>2,07 <math>\pm</math> 0,30*</b>	<b>1,80 <math>\pm</math> 0,27*</b>	1,78 $\pm$ 0,26	<b>0,0082*</b>	<b>2,13 <math>\pm</math> 0,14*</b>	<b>1,93 <math>\pm</math> 0,09*</b>	1,82 $\pm$ 0,20	<b>0,0012*</b>
NIC <sup>3</sup> (mm)	<b>2,01 <math>\pm</math> 0,30*</b>	<b>1,77 <math>\pm</math> 0,28*</b>	1,69 $\pm$ 0,32	<b>0,0151*</b>	<b>2,16 <math>\pm</math> 0,20*</b>	<b>1,88 <math>\pm</math> 0,15*</b>	1,75 $\pm$ 0,22	<b>0,0002*</b>

\*Comparación Intra-grupo; \*\* Comparación Inter-grupos; valores estadísticamente significativos en formato cursiva y negrita.

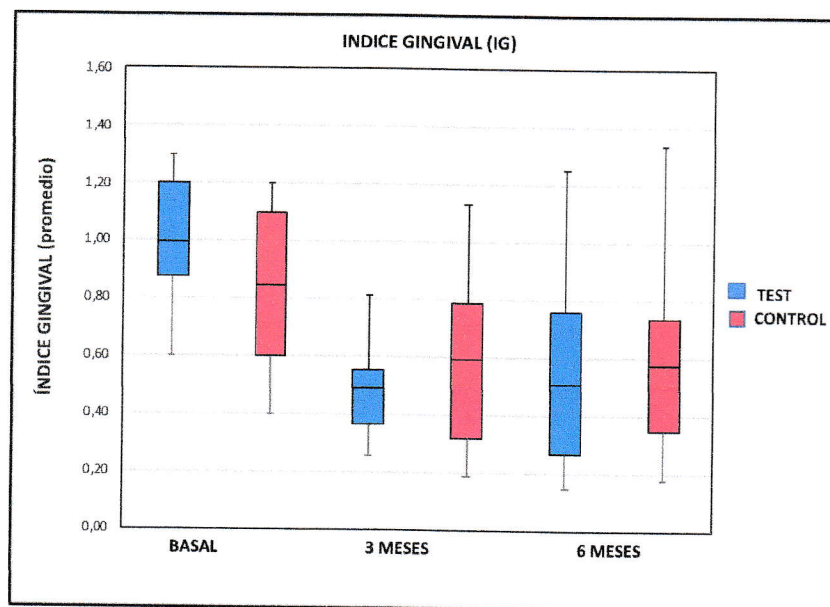
IG: Índice gingival; IP: Índice de placa; IS: Índice de sangrado al sondaje; PS: Profundidad de sondaje periodontal; NIC: Nivel de inserción clínico.

### Comparación inter-grupos de cada variable clínica analizada

#### Índice Gingival

Se observó que después de 3 meses el promedio del Índice gingival disminuyó en ambos grupos Test y Control, presentando una mayor disminución y una menor varianza en el grupo Test. Después de 6 meses los valores promedios

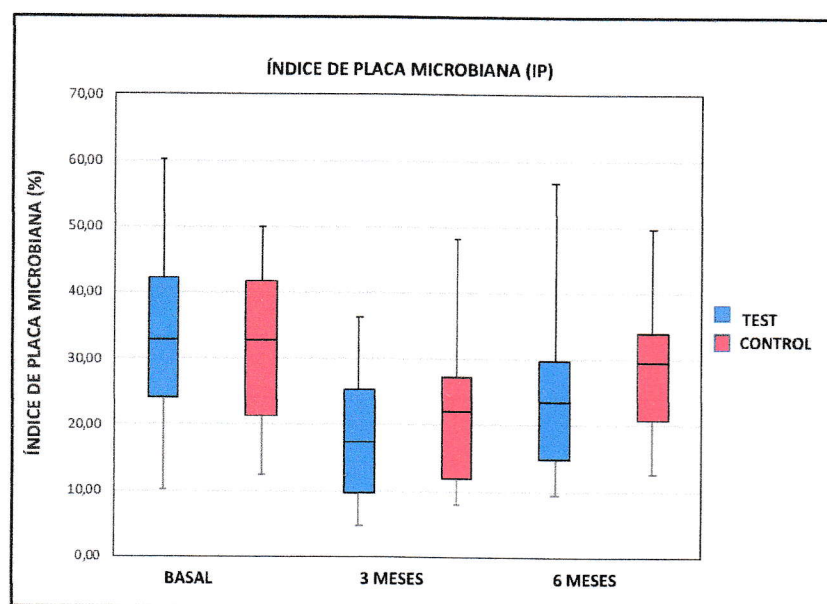
tienden a ser similares. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (**Figura 2**).



**Figura 2.** Comparación de la variable clínica Índice gingival en el basal, 3 y 6 meses.

### Índice de Placa Microbiana

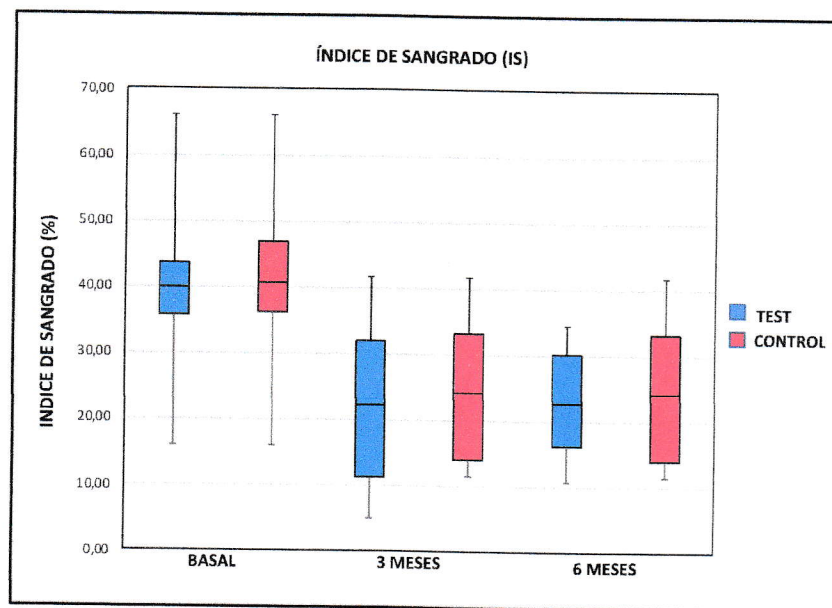
Se observó que el promedio del Índice de Placa microbiana disminuyó en ambos grupos (Test y Control). Después de 3 y 6 meses el promedio en el grupo Test se mantuvo más bajo que en el Control. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (**Figura 3**).



**Figura 3.** Comparación de la variable clínica Índice de Placa Microbiana en el basal, 3 y 6 meses.

### Índice de Sangrado al Sondaje

Se observó que el Índice de Sangrado al Sondaje disminuyó en ambos grupos Test y Control después de 3 meses, presentando una mayor disminución en el grupo Test. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (**Figura 4**).

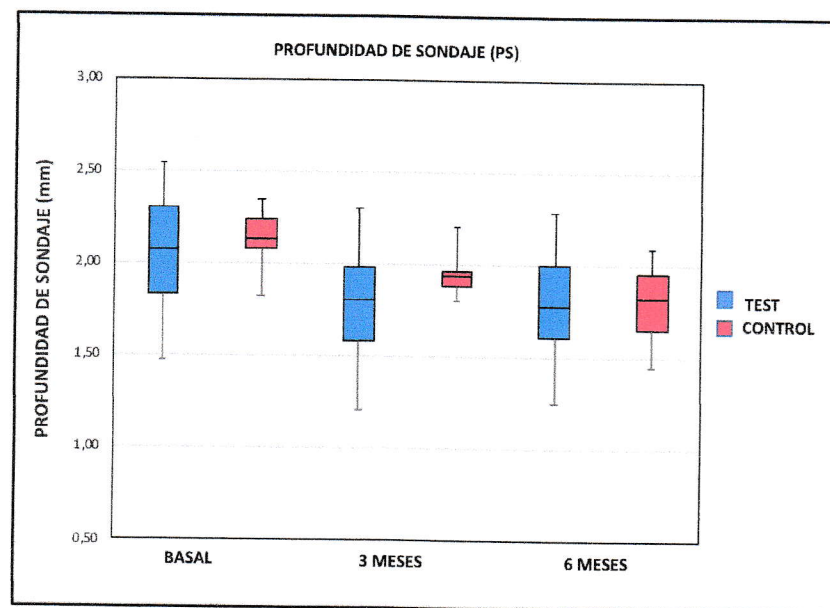


**Figura 4.** Comparación de la variable clínica Índice de sangrado en el basal, 3 y 6 meses.

### Profundidad de Sondaje

Se observó que la Profundidad de Sondaje disminuyó en ambos grupos Test y Control después de 3 meses, presentando una mayor disminución en el grupo Test. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (**Figura 5**).

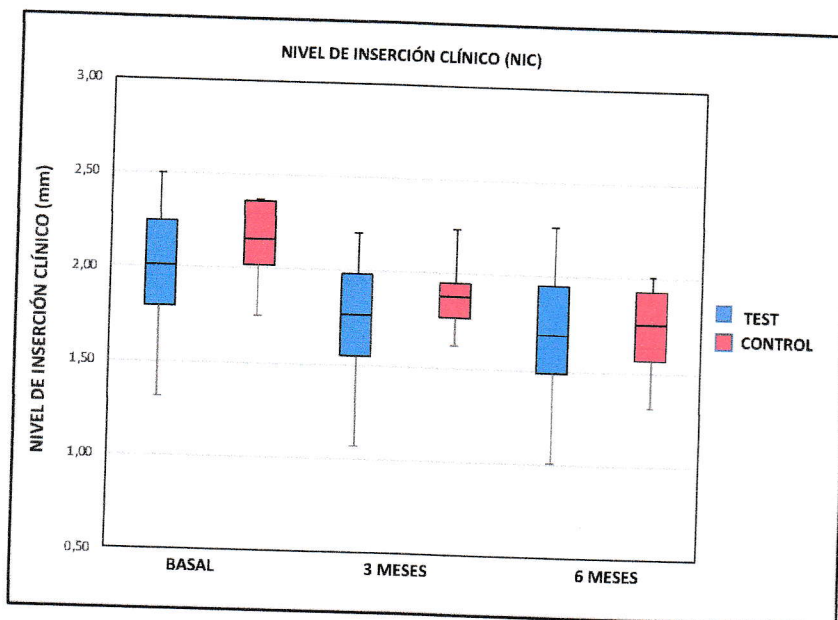




**Figura 5.** Comparación de la variable clínica Profundidad de sondaje periodontal en el basal, 3 y 6 meses.

### Nivel de Inserción clínica

Se observó que el Nivel de Inserción Clínica disminuyó en ambos grupos Test y Control después de 3 meses, presentando una mayor disminución en el grupo Test. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (**Figura 6**).



**Figura 6.** Comparación de la variable Nivel de Inserción clínico en el basal, 3 y 6 meses.

### **Comparación del Índice Gingival según severidad**

Se presenta el análisis del Índice gingival desagregado según severidad, esto es la frecuencia de detección de los códigos 0, 1 y 2.

**Tabla VI.** Índice gingival (IG) expresado como promedio y desviación estándar (DS) en el grupo Test y Control de acuerdo a la severidad.

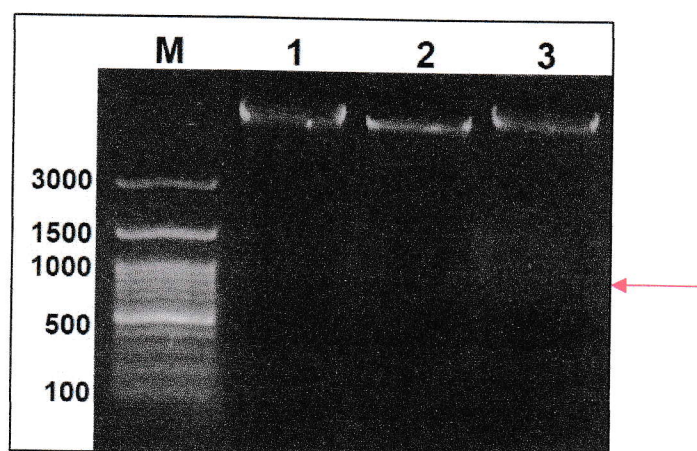
	IG	Basal (media ± DE)	3 meses (media ± DE)	6 meses (media ± DE)	p valor (intra-grupo)
<b>Grupo Test</b>	0	<b>30,28 ± 15,95*</b>	<b>60,11 ± 13,08*</b>	56,96 ± 23,97	<b>0,0000*</b>
	1	<b>51,11 ± 17,34*</b>	<b>30,03 ± 11,16*</b>	28,20 ± 15,57	<b>0,0000*</b>
	2	<b>18,61 ± 8,09*</b>	<b>9,86 ± 6,71*</b>	14,84 ± 11,47	<b>0,0004*</b>
<b>Grupo Control</b>	0	<b>32,00 ± 18,66*</b>	<b>53,81 ± 19,55*</b>	57,56 ± 23,03	<b>0,0021*</b>
	1	<b>50,92 ± 14,42*</b>	<b>32,62 ± 14,15*</b>	33,94 ± 13,17	<b>0,0007*</b>
	2	17,08 ± 11,48	13,57 ± 9,95	8,50 ± 11,75	0,3409

\*Comparación Intra-grupo; \*\* Comparación Inter-grupos; Valores estadísticamente significativos en formato cursiva y en negrita. IG: Índice Gingival.

## Resultados Microbiológicos

### Obtención de ADN genómico desde las cepas de referencia

Se purificó ADN genómico a partir desde cultivos de las cepas de referencia *P. gingivalis* ATCC 33277, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29522 y *T. forsythia* ATCC 43037 obteniendo en cada caso un ADN íntegro (**Figura 7**), como se determinó por la presencia de una banda única que migra sobre el marcador de ADN estándar de peso molecular utilizado.

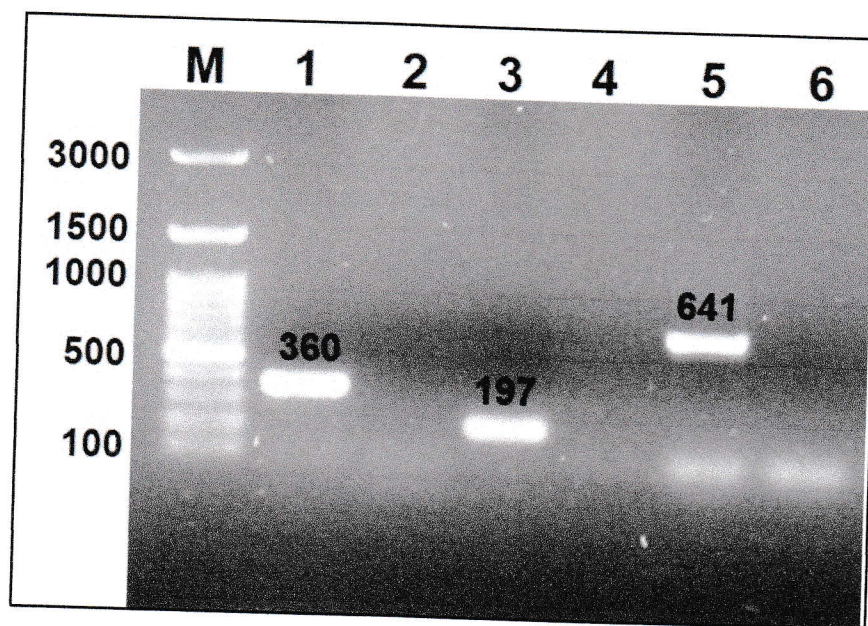


**Figura 7.** ADN genómico purificado a partir de las cepas de referencia. Se indica con flecha roja banda de migración de ADN. M: Marcador de peso molecular de ADN utilizado, se indican al lado izquierdo los pares de bases (pb) correspondientes a cada banda de éste. Carril 1. ADN genómico de *P. gingivalis*, carril 2. *A. actinomycetemcomitans*, carril 3. ADN genómico de *T. forsythia*.

### **Análisis por PCR convencional de amplicones de cada microorganismo**

Con la finalidad de comprobar la amplificación de ADN que genera cada pareja de oligonucleótidos para cada microorganismo, se realizó un ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional (PCR). Se determinó amplificación positiva, cuyos productos corresponden al tamaño descrito en cada caso (**Figura 8**). Se observa un único amplificado de tamaño específico en cada caso, de 360 pb para *A. actinomycetemcomitans*, de 197 pb para *P. gingivalis* y de 641 pb para *T. forsythia*.



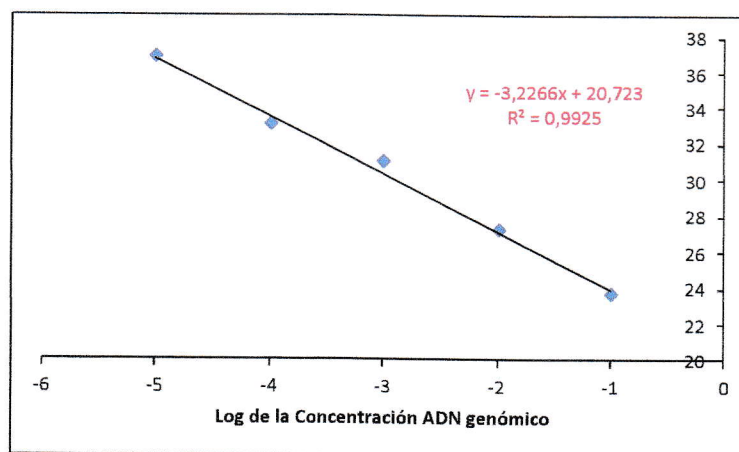


**Figura 8.** Análisis por PCR de amplicones para cada microorganismo. M: Marcador de peso molecular de ADN utilizado, se indican al lado izquierdo los pares de bases (pb) correspondientes a cada banda de éste. Carril 1: producto de PCR para *A. actinomycetemcomitans*, Carril 3: producto de PCR para *P. gingivalis*. Carril 5: producto de PCR para *T. forsythia*. Los carriles 2, 4 y 6 corresponden a los controles negativos de cada caso (H<sub>2</sub>O).

### Curvas de Calibración PCR Cuantitativo

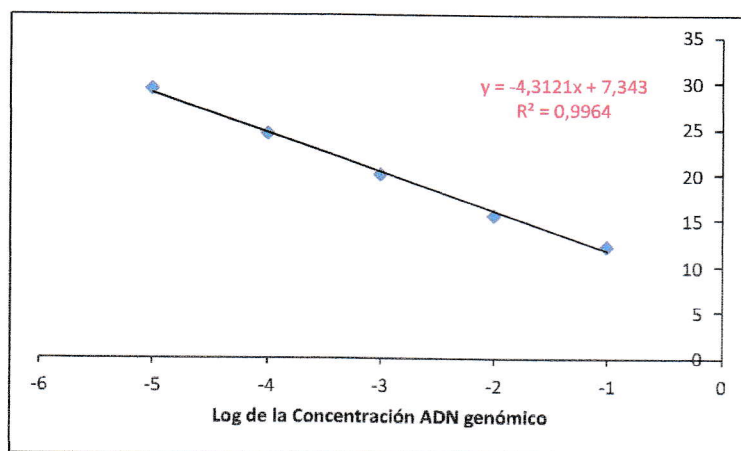
Se realizaron las curvas de calibración con ADN genómico para cada uno de los microorganismos estudiados, tal como se describe en la sección metodología. En la **Figura 9** se presenta la curva de calibración para *P. gingivalis*, en la cual

se determinó que los oligonucleótidos utilizados poseían una eficiencia de 104,14%, que se encuentra entre el rango permitido para una cuantificación óptima de este microorganismo en las muestras. Junto con esto, se determinó que el rango dinámico de concentración de ADN para la detección de *P. gingivalis* abarcó desde  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  ng/ $\mu$ L.



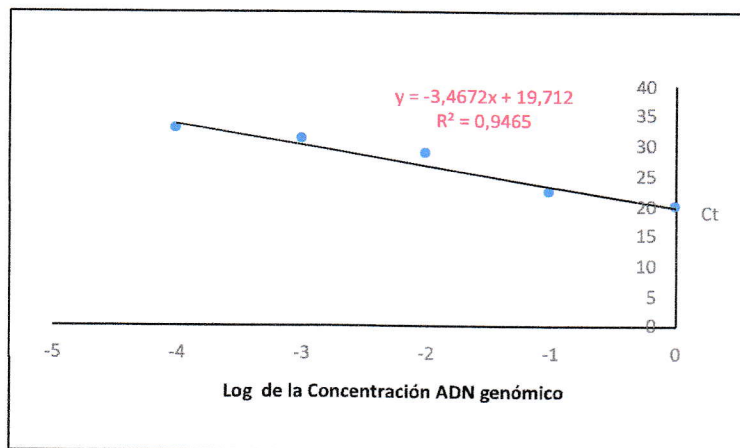
**Figura 9.** Curva de calibración obtenida para las diluciones de ADN genómico de la cepa estándar de *Porphyromonas gingivalis* (Pg).

En la **Figura 10** se presenta la curva de calibración para *A. actinomycetemcomitans*, en la cual se determinó que los oligonucleótidos utilizados poseían una eficiencia de 70,57%, que si bien corresponde a una baja eficiencia, presentan un amplio rango dinámico de concentración de ADN para la detección que va desde  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  ng/ $\mu$ L.



**Figura 10.** Curva de calibración obtenida para las diluciones de ADN genómico la cepa estándar de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa).

En la **Figura 11** se presenta la curva de calibración para *T. forsythia*, en la cual se determinó que los oligonucleótidos utilizados poseían una eficiencia de 94,28% que se encuentra entre el rango permitido para una cuantificación óptima de este microorganismo en las muestras. Junto con esto, se determinó que el rango dinámico de concentración de ADN para la detección de *T. forsythia* abarcó desde  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  ng/ $\mu$ L.



**Figura 11.** Curva de calibración obtenida para las diluciones de ADN genómico de la cepa estándar de *Tannerella forsythia* (Tf).

### **Cuantificación de *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *A. actinomycetemcomitans* en las muestras clínicas en el tiempo basal**

Se presentan los valores de las variables microbiológicas analizadas separadas por grupo Test y Control, en el tiempo basal (**Tabla VII**). No fue posible detectar diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).



**Tabla VII.** Concentración de *Porphyromonas gingivalis* (ng/ $\mu$ L) expresados como promedios y desviación estándar (DE) en los grupos Test y Control. Comparación inter-grupo en el tiempo basal ANOVA ( $p < 0,05$ ).

VARIABLES	TEST (media $\pm$ DE)	CONTROL (media $\pm$ DE)	DIFERENCIAS (media $\pm$ DE)	p valor (inter-grupo)
<b>Pg</b>	$1,0 \times 10^{-1} \pm 1,7 \times 10^{-1}$	$6,8 \times 10^{-2} \pm 2,2 \times 10^{-1}$	$0,0332 \pm 0,0540$	0,651
<b>Tf</b>	$1,6 \times 10^{-1} \pm 3,4 \times 10^{-1}$	$2,9 \times 10^{-2} \pm 4,9 \times 10^{-2}$	$0,1305 \pm 0,2910$	0,299
<b>Aa</b>	$1,2 \times 10^{-4} \pm 2,4 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-5} \pm 1,4 \times 10^{-4}$	$0,0000 \pm 0,0001$	0,508

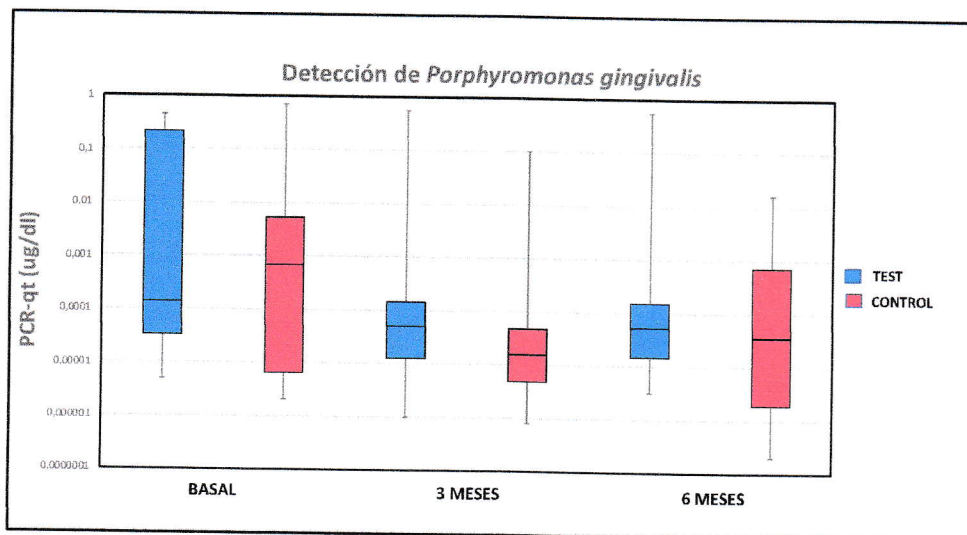
### **Cuantificación de *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *A. actinomycetemcomitans* en las muestras clínicas a los 3 y 6 meses**

Se determinó la presencia de *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *A. actinomycetemcomitans* en el 91 %, 60% y 51 % de las muestras de placa subgingival respectivamente, sus niveles se presentan expresados como ng/ $\mu$ L de ADN genómico presente de la bacteria. Se presentan los valores de las variables microbiológicas analizadas separadas por grupo Test y Control, a los 3 y 6 meses (**Tabla VIII**). En la comparación inter-grupos no fue posible detectar diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). En la comparación inter-grupos presentadas en la Figura 12, Figura 13 y Figura 14 se puede comparar la variabilidad, esto es las desviaciones estándar observadas en las variables en los distintos tiempos de evaluación, en la concentración de *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *A. actinomycetemcomitans* respectivamente. La disminución y

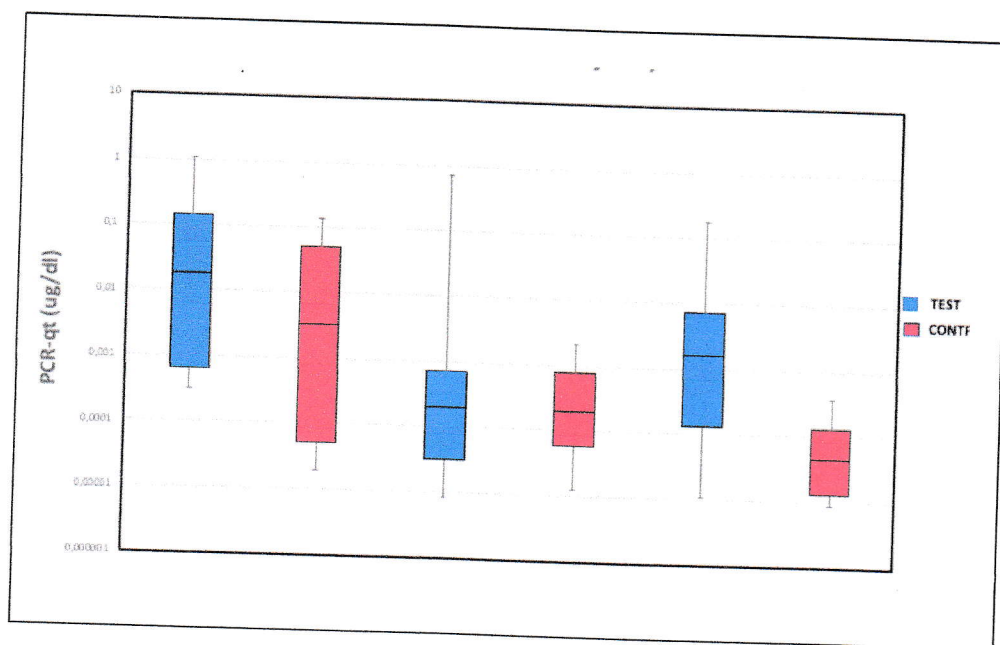
desviación estándar detectadas en las concentraciones de *P. gingivalis* son similares en el tiempo basal y a los 3 meses en el grupo Test y Control. Sin embargo después de 6 meses la desviación estándar observada del grupo Test es mucho menor de la observada en el grupo Control (Figura 12). La disminución y desviación estándar detectada en los distintos tiempos de evaluación fue similar en los distintos tiempos para *T. forsyhtia* en el grupo Test y Control (Figura 13). Para *A. actinomycetemcomitans* la disminución y desviación estándar fue menor en los diatintos tiempos en el grupo Control (Figura 14).

**Tabla VIII.** Concentración de *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *A. actinomycetemcomitans* (promedio  $\pm$  desviación estándar) obtenidos a los 3 y 6 meses.

	TEST (media $\pm$ DE)	CONTROL (media $\pm$ DE)	DIFERENCIAS (media $\pm$ DE)	p valor (inter-grupo)
<b>Pg</b>				
3 MESES	$3,5 \times 10^{-2} \pm 1,4 \times 10^{-1}$	$9,7 \times 10^{-3} \pm 3,1 \times 10^{-2}$	$15,3539 \pm 0,8233$	0,567
6 MESES	$3,7 \times 10^{-2} \pm 1,5 \times 10^{-1}$	$1,8 \times 10^{-3} \pm 5,2 \times 10^{-3}$	$17,5745 \pm 0,1417$	0,455
<b>Tf</b>				
3 MESES	$7,0 \times 10^{-2} \pm 2,2 \times 10^{-1}$	$5,4 \times 10^{-4} \pm 2,8 \times 10^{-4}$	$0,069728 \pm 0,2208$	0,421
6 MESES	$2,1 \times 10^{-2} \pm 5,6 \times 10^{-2}$	$9,3 \times 10^{-5} \pm 1,3 \times 10^{-4}$	$0,020686 \pm 0,0560$	0,349
<b>Aa</b>				
3 MESES	$1,5 \times 10^{-4} \pm 3,2 \times 10^{-4}$	$8,1 \times 10^{-7} \pm 1,1 \times 10^{-6}$	$0,000148 \pm 0,0003$	0,185
6 MESES	$8,0 \times 10^{-5} \pm 2,0 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-6} \pm 3,0 \times 10^{-6}$	$0,000078 \pm 0,0002$	0,263

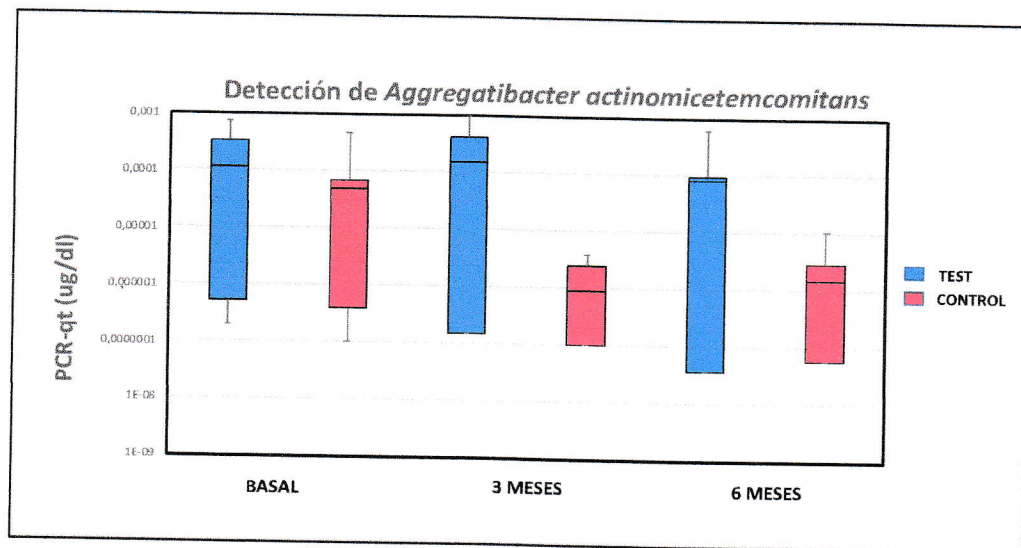


**Figura 12.** Detección de *P. gingivalis* en los grupos Test (color azul) y Control (rojo). Se presenta graficado los Q1, Q2 y Q3, con sus correspondientes límites de error superior e inferior con un nivel de confianza del 95%.



**Figura 13.** Detección de *T. forsythia* en los grupos Test (color azul) y Control (rojo). Se presenta graficado los Q1, Q2 y Q3, con sus correspondientes límites de error superior e inferior con un nivel de confianza del 95%.





**Figura 14.** Detección de *A. actinomycetemcomitans* en los grupos Test (color azul) y Control (rojo). Se presenta graficado los Q1, Q2 y Q3, con sus correspondientes límites de error superior e inferior con un nivel de confianza del 95%.

## VI. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar el efecto clínico y microbiológico de la utilización de probiótico de *L. rhamnosus SP1* como adjunto en el tratamiento de la gingivitis. Para ello se diseñó el presente ensayo clínico aleatorizado doble ciego, en el cuál se consideró un periodo de intervención y de seguimiento de tres meses (dosis diaria de  $2 \times 10^8$  UFC). La cepa probiótica utilizada, fue adquirida desde la empresa Clerici Sacco, Italia. es una de las cepas que más se ha estudiado en su relación con odontología, presenta evidencia que avala su uso como coadyuvante en la terapia periodontal y ya se ha utilizado en el marco del proyecto Fondecyt que financia el presente trabajo de investigación en pacientes con periodontitis.

Los ensayos clínicos aleatorizados bien diseñados y correctamente ejecutados proporcionan la mejor evidencia sobre el efecto de las intervenciones sanitarias, pero una metodología inadecuada puede resultar en estimaciones sesgadas, es por eso que se deben considerar múltiples factores relevantes en su ejecución, entre ellos calcular el tamaño de la muestra, realizar calibración, aleatorización, ocultamiento de la secuencia, enmascaramiento, seguimiento y análisis según

intención de tratar (Cobos-Carbó & Augustovski, 2011). Cada uno de estos aspectos fue considerado en la ejecución de este trabajo de investigación. El trabajo con adolescentes fue difícil de ejecutar ya que se observó una alta tasa de pérdidas durante el seguimiento, lo que hizo que para alcanzar el tamaño de la muestra mínimo requerido (15 pacientes por grupo) se necesitara un periodo de tiempo de 18 meses. Los sujetos que abandonaron el estudio no fueron incluidos en el análisis de los datos. No se señala en la literatura biomédica disponible con ensayos clínicos similares el tiempo que han requerido en el trabajo con adolescentes, pero es un aspecto que debe ser considerado en la ejecución de futuros estudios científicos con población similar.

Al analizar las variables clínicas periodontales, índice gingival (IG), índice de sangrado al sondaje (IS), índice de placa bacteriana (IP), profundidad de sondaje (PS) y nivel de inserción clínico (NIC) fue posible detectar en la comparación intra-grupo después de 3 meses de intervención, que siempre se logró una mejoría clínica estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). Una posible explicación a este fenómeno es que la eliminación de placa microbiana por el profesional más la instrucción de higiene oral fue suficiente para controlar la gingivitis (Sinkiewicz, Cronholm, Ljunggren, Dahlén, & Bratthall, 2010). Resultados similares fueron obtenidos utilizando distintas cepas probióticas

como *L. reuteri* (Iniesta et al., 2012; Krasse et al., 2006; Shimauchi et al., 2008), *L. salivarius* (Shimauchi et al., 2008) o combinaciones de distintas cepas (Nadkerny et al., 2015; Purunaik et al., 2014).

Las variables clínicas índice gingival e índice de sangrado al sondaje fueron las que presentaron una mayor diferencia estadísticamente significativa, estos resultados son similares a los encontrados por Krasse y cols. y Twetman y cols. En el estudio de Krasse y cols (2006) después de 2 semanas de intervención se reportó que el índice gingival disminuyó en forma estadísticamente significativa en ambos grupos (Test y Control) (Krasse et al., 2006). En el estudio de Twetman y cols (2009) después de 4 semanas de intervención se reportó que el índice de sangrado al sondaje disminuyó en forma estadísticamente significativa en el grupo Test (Twetman et al., 2009).

En el seguimiento entre los 3 y los 6 meses no fue posible detectar diferencias estadísticamente significativas en las variables clínicas analizadas, esto probablemente es debido a que el efecto de los probióticos según los estudios que se han realizado en la flora intestinal es de corto plazo o transitorio. Según Brigidi (2003), después de tres días de ingesta de probiótico es posible conseguir su colonización y su permanencia es de alrededor de seis a siete



días (Brigidi, Swennen, Vitali, Rossi, & Matteuzzi, 2003). No existen estudios clínicos con seguimiento en sujetos con gingivitis que hayan intentado determinar su efecto a lo largo del tiempo, con el fin de determinar con exactitud un radio de tiempo de acción.

En la comparación inter-grupos (entre el grupo Test y el Control), no se observaron diferencias estadísticamente significativas, sin embargo se detectó una mayor mejoría clínica en el grupo Test, esto es una mayor disminución en los valores de las variables IG, IP, IS, PS y NIC. Esta ausencia de diferencias clínicas estadísticamente significativas ha sido reportado en varios estudios clínicos sobre el tema de investigación (Iniesta et al., 2012; J.-K. Lee et al., 2015; Staab et al., 2009). Un efecto clínico benéfico de los probióticos en pacientes con gingivitis ha sido también reportado por Krasse y Schlagenhaut. Krasse y cols. (2006) encontró que los pacientes con gingivitis en tratamiento con probiótico de *L. reuteri*, presentaban una mejora clínica estadísticamente significativa en el índice de placa microbiana e índice gingival (Krasse et al., 2006). Schlagenhaut y cols. (2016) estudió a un grupo de pacientes embarazadas con gingivitis y encontró que las variables analizadas mejoraron en el grupo que se encontró tomando probióticos (Schlagenhaut et al., 2016).



Al analizar la variable Índice gingival en forma desagregada, esto es, de acuerdo a su severidad (frecuencia de detección de códigos 0, 1 y 2), fue posible detectar diferencias estadísticamente significativas en el código 2 solo en el grupo Test ( $p < 0.05$ ). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Montero y cols. (2017) quién encontró que la mejoría clínica obtenida en el grupo de pacientes en tratamiento con probiótico de *L. reuteri* era solo estadísticamente significativa en los pacientes que presentaban gingivitis más severas, esto es mayor valor del índice gingival (Montero et al., 2017).

En el análisis microbiológico no fue posible detectar diferencias estadísticamente significativas en el recuento de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* ni *T. forsythia* a los 0, 3 y 6 meses. Las diferencias en el recuento de los microorganismos estudiados fueron mínimas y no fue posible establecer a través de ellas alguna clara tendencia que pudiese relacionarse con las características clínicas observadas, No existen estudios publicados en la literatura científica que permitan comparar los recuentos microbiológicos obtenidos en el presente trabajo, no obstante, Alanzi y cols (2018), realizó un ensayo clínico aleatorizado en el que determinó el efecto de *L. rhamnosus* y *B. lactis* en adolescentes, y encontró que los niveles de *P. gingivalis* se redujeron en forma significativa en las muestras de placa bacteriana obtenida del grupo

Test (0,99 a 0,89 log cfu/ml), sin embargo los niveles de *A. actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* y *Fusobacterium nucleatum* no fueron estadísticamente significativos (Alanzi et al., 2018). Actualmente existen estudios científicos que señalan que en la patogenia de las enfermedades periodontales, incluida la gingivitis es preciso estudiar la presencia de clusters o grupos de bacterias más que especies individuales y las funciones bacterianas por ejemplo la proteólisis, ensamblaje flagelar, movilidad, etc, puede ser un aspecto mucho más importante que la determinación de especies particulares. Este nuevo enfoque busca la determinación de la expresión genética de algunas proteínas más que el enfoque basado en la determinación de algunas especies (Trombelli, Farina, Silva, & Tatakis, 2018).

Entre los mecanismos de acción de las cepas probióticas que pudiesen tener un impacto en la salud sistémica y gingival, lo que hace relevante el desarrollo de su estudio, se encuentra abundante literatura científica. Stamatova y cols. (2009) reportó que las cepas probióticas pueden bloquear los sitios de unión en el hospedero de las bacterias patógenas (Stamatova & Meurman, 2009). Jacobsen y cols. (1999) mencionó que las cepas probióticas pueden inhibir las bacterias patógenas sin alterar la composición de la microbiota comensal, lo que podría aumentar el efecto benéfico (Jacobsen et al., 1999). Ince y cols.

(2015) reportó que los probióticos pueden disminuir la producción de TNF- $\alpha$ , IL-8 y aumentar los niveles de TIMP-1 (Ince et al., 2015). Sookkhee y cols (2001) y Köll-Klais y cols (2005) reportaron que la producción de ácido láctico por parte de cepas probióticas de *Lactobacillos*, pueden penetrar la pared bacteriana de especies patógenas como *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans* y *Prevotella intermedia*, inhibiendo su proliferación (Köll-Klais et al., 2005; Sookkhee, Chulasiri, & Prachyabrued, 2001).

Es necesario realizar más ensayos clínicos aleatorizados doble ciego sobre este tema, con mayor tamaño de la muestra e incorporando a pacientes con un mayor número de sitios con inflamación severa. Existen estudios que señalan que cuando se utiliza el índice gingival como variable de resultado principal, las diferencias significativas se observan entre los grupos solo en aquellos sitios en los que presentan en el basal un valor de 2 o 3 (Montero et al., 2017).



## VII. CONCLUSIONES

Los pacientes con gingivitis tratados con probiótico de *L. rhamnosus* como adjunto a la terapia convencional presentan una mejora clínica en las variables índice gingival, índice de placa bacteriana, índice de sangrado al sondaje, profundidad de sondaje y nivel de inserción clínica sin presentar diferencias estadísticamente significativas.

Los pacientes con gingivitis tratados con probiótico de *L. rhamnosus* como adjunto a la terapia convencional no presentan diferencias estadísticamente significativas en el recuento de periodontopatógenos *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythia* que los tratados con el método convencional.

Los pacientes con gingivitis tratados con probiótico de *L. rhamnosus* como adjunto a la terapia convencional presentan una menor severidad del índice gingival que los tratados con el método convencional.

## VIII. SUGERENCIAS

Se requieren más estudios clínicos aleatorizados doble ciego bien diseñados que intenten determinar los efectos de probióticos en la salud periodontal.

Se requiere utilizar distintas cepas probióticas o combinación de ellas de manera de lograr potenciar sus efectos benéficos.

Se debe estudiar el efecto de los probióticos en relación a la diabetes y a embarazadas.

En el estudio de la gingivitis deben considerarse idealmente pacientes con gingivitis severa (alto número de códigos 2 y 3).

Se debe seguir con el estudio del tratamiento de probiótico en pacientes fumadores.

## IX. RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** La gingivitis es una de las enfermedades periodontales más prevalente a nivel mundial. Su tratamiento y control es un tema muy relevante ya que es considerada como un requisito para el subsecuente desarrollo de la periodontitis. Ciertas especies bacterianas asociadas a la periodontitis como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Tannerella forsythia* se encuentran también presentes en pacientes con gingivitis desde temprana edad. Existe evidencia científica que sugiere que el uso de probióticos puede lograr cambios clínicos y microbiológicos, posibilitando optimizar su tratamiento.

**OBJETIVO:** Evaluar el efecto del uso de *Lactobacillus rhamnosus* en los parámetros clínicos (índice de placa bacteriana, índice gingival, índice de sangrado al sondaje, profundidad de sondaje y nivel de inserción clínica) y recuento microbiano de *P. gingivalis* (*Pg*), *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*) y *T. forsythia* (*Tf*) en adolescentes y adultos-jóvenes con gingivitis tratados con terapia periodontal convencional versus terapia periodontal convencional y probiótico de *Lactobacillus rhamnosus* comparado con placebo.

**METODOLOGÍA:** Se realizó un ensayo clínico de diseño paralelo, aleatorizado, enmascarado, con control mediante placebo. Se reclutaron por conveniencia sujetos adolescentes y adultos jóvenes con diagnóstico de gingivitis inducida por placa bacteriana que asistían a Pre-universitario, estudiantes de odontología o sujetos que asistían a Unidad de Diagnóstico y Admisión de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y que cumplieron con los criterios de inclusión. Sin diferencias de sexo o etnia. Cada uno fue asignado aleatoriamente al grupo test o control. El grupo test (n=18) recibió un sobre con polvo de disolución oral, el que debió consumir 1 vez por día, por 3 meses, que contenía *L. rhamnosus* SP1 ( $1 \times 10^8$  UFC/ml). El grupo control (n=15) recibió un placebo con las mismas características que el del grupo experimental, pero sin probiótico. Todos los participantes recibieron tratamiento periodontal no quirúrgico, se les enseñó la técnica de Bass modificada y a utilizar seda dental. Se consignaron los parámetros clínicos y se tomaron muestras de biofilm subgingival, para determinar el recuento de *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *A. actinomycetemcomitans* mediante PCR en tiempo real. Los parámetros clínicos y microbiológicos fueron consignados en el tiempo basal, al finalizar la intervención con el probiótico/placebo, a los 3 y 6 meses de seguimiento. El



análisis de datos se realizó según intención de tratar y se aplicaron pruebas estadísticas según la naturaleza de la variable.

**RESULTADOS:** Se detectó una disminución en todas las variables clínicas analizadas, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. En el recuento del índice gingival según severidad, pudo detectarse diferencias estadísticamente significativas en el 0, 1 y 2. En el grupo Control se detectó diferencias estadísticamente significativas solo en los códigos 0 y 1. En el análisis microbiológico no se detectó diferencias estadísticamente significativas en el recuento de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *T. forsythia*.

**CONCLUSIONES:** Los pacientes con gingivitis tratados con probiótico de *L. rhamnosus* como adjunto a la terapia convencional presentan una mejora clínica en las variables índice gingival, índice de placa bacteriana, índice de sangrado al sondaje, profundidad de sondaje y nivel de inserción clínica, presentando diferencias estadísticamente significativas en el código 2 del índice gingival versus el control. No se detectó diferencias estadísticamente significativas en el recuento de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythia*.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Ahola, A. J., Yli-Knuutila, H., Suomalainen, T., Poussa, T., Ahlström, A., Meurman, J. H., & Korpela, R. (2002). Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Archives of Oral Biology*, 47(11), 799–804. Retrieved from <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=12446187&retmode=ref&cmd=prlinks>
- Alander, M., Satokari, R., Korpela, R., Saxelin, M., Vilpponen-Salmela, T., Mattila-Sandholm, T., & Wright, von, A. (1999). Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(1), 351–354.
- Alanzi, A., Honkala, S., Honkala, E., Varghese, A., Tolvanen, M., & Söderling, E. (2018). Effect of *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on gingival health, dental plaque, and periodontopathogens in adolescents: a randomised placebo-controlled clinical trial. *Beneficial Microbes*, 1–10. <http://doi.org/10.3920/BM2017.0139>
- Albandar, J. M. (2002). Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 29, 177–206. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12102708>
- Armitage, G. C. (1995). Clinical evaluation of periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 7(1), 39–53. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1995.tb00035.x>
- Berezow, A. B., Berezow, A. B., Darveau, R. P., & Darveau, R. P. (2010). Microbial shift and periodontitis. *Periodontology 2000*, 55(1), 36–47. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2010.00350.x>
- Brigidi, P., Swennen, E., Vitali, B., Rossi, M., & Matteuzzi, D. (2003). PCR detection of *Bifidobacterium* strains and *Streptococcus thermophilus* in feces of human subjects after oral bacteriotherapy and yogurt consumption. *International Journal of Food Microbiology*, 81(3), 203–209.
- Brunser T, O. (2013). Las posibilidades del empleo de lactobacilos en la gastroenterología y la nutrición humana. *Revista Chilena De Nutrición*, 40(3), 290–302. <http://doi.org/10.4067/S0717-75182013000300012>
- Byun, R., Nadkarni, M. A., Chhour, K.-L., Martin, F. E., Jacques, N. A., & Hunter,



- N. (2004). Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(7), 3128–3136. <http://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3128-3136.2004>
- Chapple, I. L. C., Van der Weijden, F., Doerfer, C., Herrera, D., Shapira, L., Polak, D., et al. (2015). Primary prevention of periodontitis: managing gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(Suppl. 6), S71–S76. <http://doi.org/10.1111/jcpe.12366>
- Cobos-Carbó, A., & Augustovski, F. (2011). Declaración CONSORT 2010: actualización de la lista de comprobación para informar ensayos clínicos aleatorizados de grupos paralelos. *Medicina Clínica*, 137(5), 213–215. <http://doi.org/10.1016/j.medcli.2010.09.034>
- Çaglar, E., Kavaloglu Cildir, S., Ergeneli, S., Sandalli, N., & Twetman, S. (2009). Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets, 64(5), 314–318. <http://doi.org/10.1080/00016350600801709>
- Dar, H. Y., Shukla, P., Mishra, P. K., Anupam, R., Mondal, R. K., Tomar, G. B., et al. (2018). *Lactobacillus acidophilus* inhibits bone loss and increases bone heterogeneity in osteoporotic mice via modulating Treg-Th17 cell balance. *Bone Reports*, 8, 46–56. <http://doi.org/10.1016/j.bonr.2018.02.001>
- Davey, M. E. (2006). Techniques for the growth of *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *Periodontology 2000*, 42(1), 27–35. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00183.x>
- Drisko, C. L., Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology, Cochran, D. L., Blieden, T., Bouwsma, O. J., Cohen, R. E., et al. (2000). Position Paper; Sonic and Ultrasonic Scalers in Periodontics. *Journal of Periodontology*, 71(11), 1792–1801. <http://doi.org/10.1902/jop.2000.71.11.1792>
- Eke, P. I., Dye, B. A., Wei, L., Thornton-Evans, G. O., Genco, R. J., & on behalf of the participating members of the CDC Periodontal Disease Surveillance workgroup: James Beck (University of North Carolina, Chapel Hill, USA), Gordon Douglass (Past President, American Academy of Periodontology), Roy Page (University of Washin. (2012). Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: 2009 and 2010. *Journal of Dental Research*, 91(10), 914–920. <http://doi.org/10.1177/0022034512457373>
- Elías-Boneta, A. R., Encarnación, A., Rivas-Tumanyan, S., Berríos-Ouslán, B.

- C., García-Godoy, B., Murillo, M., et al. (2017). Prevalence of Gingivitis in a Group of 35- to 70-Year-Olds Residing in Puerto Rico. *Puerto Rico Health Sciences Journal*, 36(3), 140–145.
- Fine, D. H., Kaplan, J. B., Kachlany, S. C., & Schreiner, H. C. (2006). How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: A model for infectious diseases. *Periodontology* 2000, 42(1), 114–157. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00189.x>
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *The Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), 365–378. Retrieved from <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=2666378&retmode=ref&cmd=prlinks>
- Goodson, J. M., Tanner, A., McArdle, S., Dix, K., & Watanabe, S. M. (1991). Multicenter evaluation of tetracycline fiber therapy. III. Microbiological response. *Journal of Periodontal Research*, 26(5), 440–451. Retrieved from <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=1832457&retmode=ref&cmd=prlinks>
- Gorbach, S. (1996). The discovery of *Lactobacillus* GG. *Nutr Today*, 31, 2S–4S.
- Haffajee, A. D., Teles, R. P., & Socransky, S. S. (2006). The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. *Periodontology* 2000, 42, 219–258. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00191.x>
- Hajishengallis, G., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(10), 717–725. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2873>
- Harini, P. M., & Anegundi, R. T. (2010). Efficacy of a probiotic and chlorhexidine mouth rinses: A short-term clinical study. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 28(3), 179–4. <http://doi.org/10.4103/0970-4388.73799>
- Heitz-Mayfield, L. J. A., & Lang, N. P. (2013). Surgical and nonsurgical periodontal therapy. Learned and unlearned concepts. *Periodontology* 2000, 62(1), 218–231. <http://doi.org/10.1111/prd.12008>
- Holt, S. C., & Ebersole, J. L. (2005). *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the “red complex,” a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology* 2000,



38(1), 72–122. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00113.x>

- Huang, S., Yang, F., Zeng, X., Chen, J., Li, R., Wen, T., et al. (2011). Preliminary characterization of the oral microbiota of Chinese adults with and without gingivitis. *BMC Oral Health*, 11(1), 1694. <http://doi.org/10.1186/1472-6831-11-33>
- Idrees, M. M., Azzeghaiby, S. N., Hammad, M. M., & Kujan, O. B. (2014). Prevalence and severity of plaque-induced gingivitis in a Saudi adult population. *Saudi Medical Journal*, 35(11), 1373–1377.
- Ierardo, G., Bossù, M., Tarantino, D., Trinchieri, V., Sfasciotti, G. L., & Polimeni, A. (2010). The arginine-deiminase enzymatic system on gingivitis: preliminary pediatric study. *Annali Di Stomatologia*, 1(1), 8–13.
- Igic, M., Kesic, L., Lekovic, V., Apostolovic, M., Mihailovic, D., Kostadinovic, L., & Milasin, J. (2012). Chronic gingivitis: the prevalence of periodontopathogens and therapy efficiency. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 31(8), 1911–1915. <http://doi.org/10.1007/s10096-011-1520-7>
- Ince, G., Gursoy, H., İpçi, Ş. D., Cakar, G., Emekli-Alturfan, E., & Yilmaz, S. (2015). Clinical and Biochemical Evaluation of Lozenges Containing *Lactobacillus reuteri* as an Adjunct to Non-Surgical Periodontal Therapy in Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 86(6), 746–754. <http://doi.org/10.1902/jop.2015.140612>
- Iniesta, M., Herrera, D., Montero, E., Zurbriggen, M., Matos, A. R., Marín, M. J., et al. (2012). Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus reuteri*-containing tablets on the subgingival and salivary microbiota in patients with gingivitis. A randomized clinical trial., 39(8), 736–744. <http://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2012.01914.x>
- Jacobsen, C. N., Rosenfeldt Nielsen, V., Hayford, A. E., Møller, P. L., Michaelsen, K. F., Paerregaard, A., et al. (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 4949–4956. Retrieved from [/pmc/articles/PMC91666/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC91666/?report=abstract)
- Kadowaki, T., Nakayama, K., Okamoto, K., Abe, N., Baba, A., Shi, Y., et al. (2000). *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence determinants in

- progression of periodontal diseases. *Journal of Biochemistry*, 128(2), 153–159.
- Karuppaiah, R. M., Shankar, S., Raj, S. K., Ramesh, K., Prakash, R., & Kruthika, M. (2013). Evaluation of the efficacy of probiotics in plaque reduction and gingival health maintenance among school children - A Randomized Control Trial. *Journal of International Oral Health : JIOH*, 5(5), 33–37. <http://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAD-0006-2016>
- Kistler, J. O., Booth, V., Bradshaw, D. J., & Wade, W. G. (2013). Bacterial Community Development in Experimental Gingivitis. *Plos One*, 8(8). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0071227>
- Korecka, A., & Arulampalam, V. (2012). The gut microbiome: scourge, sentinel or spectator? *Journal of Oral Microbiology*, 4(1), 9367. <http://doi.org/10.3402/jom.v4i0.9367>
- Köll-Klais, P., Mändar, R., Leibur, E., Marcotte, H., Hammarström, L., & Mikelsaar, M. (2005). Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiology and Immunology*, 20(6), 354–361. <http://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2005.00239.x>
- Krasse, P., Carlsson, B., Dahl, C., Paulsson, A., Nilsson, A., & Sinkiewicz, G. (2006). Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swedish Dental Journal*, 30(2), 55–60.
- Lee, J.-K., Kim, S. J., Ko, S.-H., Ouweland, A. C., & Ma, D. S. (2015). Modulation of the host response by probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 in experimental gingivitis. *Oral Diseases*, 21(6), 705–712. <http://doi.org/10.1111/odi.12332>
- Lee, S. M., Yoo, S. Y., Kim, H. S., Kim, K. W., Yoon, Y. J., Lim, S. H., et al. (2005). Prevalence of putative periodontopathogens in subgingival dental plaques from gingivitis lesions in Korean orthodontic patients. *Journal of Microbiology*, 43(3), 260–265.
- Li, Y., Lee, S., Hujoel, P., Su, M., Zhang, W., Kim, J., et al. (2010). Prevalence and severity of gingivitis in American adults. *American Journal of Dentistry*, 23(1), 9–13.
- Lilly, D. M., & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science (New York, N.Y.)*, 147(3659), 747–



748. <http://doi.org/10.1126/science.147.3659.747>

- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <http://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Majamaa, H., Isolauri, E., Saxelin, M., & Vesikari, T. (1995). Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 20(3), 333–338. Retrieved from <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=7608829&retmode=ref&cmd=prlinks>
- Mayanagi, G., Kimura, M., Nakaya, S., Hirata, H., Sakamoto, M., Benno, Y., & Shimauchi, H. (2009). Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets on periodontopathic bacteria: a double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 36(6), 506–513. <http://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01392.x>
- Meurman, J. H. (2005). Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *European Journal of Oral Sciences*, 113(3), 188–196. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2005.00191.x>
- Montero, E., Iniesta, M., Rodrigo, M., Marín, M. J., Figuero, E., Herrera, D., & Sanz, M. (2017). Clinical and microbiological effects of the adjunctive use of probiotics in the treatment of gingivitis: A randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(7), 708–716. <http://doi.org/10.1111/jcpe.12752>
- Moore, L. V. H., Moore, W. E. C., Cato, E. P., Smibert, R. M., Burmeister, J. A., Best, A. M., & Ranney, R. R. (2016). Bacteriology of Human Gingivitis. *Journal of Dental Research*, 66(5), 989–995. <http://doi.org/10.1177/00220345870660052401>
- Morales, A., Bravo, J., Baeza, M., Werlinger, F., & Gamonal, J. (2016). Periodontal disease as a chronic non transmissible diseases: Paradigm shift. *Revista Clínica De Periodoncia, Implantología Y Rehabilitación Oral*, 9(3), 284. <http://doi.org/10.1016/j.piro.2016.11.001>

- Morinushi, T., Lopatin, D. E., Van Poperin, N., & Ueda, Y. (2000). The relationship between gingivitis and colonization by *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in children. *Journal of Periodontology*, 71(3), 403–409. <http://doi.org/10.1902/jop.2000.71.3.403>
- Mostafa, B., & El-Refai, I. (2018). Prevalence of Plaque-Induced Gingivitis in a Sample of the Adult Egyptian Population. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 6(3), 554–558. <http://doi.org/10.3889/oamjms.2018.131>
- Müller, H. P., Heinecke, A., Zöller, L., Fuhrmann, A., & Eger, T. (2001). Gingivitis in young adults with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Clinical Oral Investigations*, 5(2), 83–88. <http://doi.org/10.1007/s007840100113>
- Nadkerny, P. V., Ravishankar, P. L., Pramod, V., Agarwal, L. A., & Bhandari, S. (2015). A comparative evaluation of the efficacy of probiotic and chlorhexidine mouthrinses on clinical inflammatory parameters of gingivitis: A randomized controlled clinical study. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 19(6), 633–639. <http://doi.org/10.4103/0972-124X.168491>
- O'Brien-Simpson, N. M., Veith, P. D., Dashper, S. G., & Reynolds, E. C. (2004). Antigens of bacteria associated with periodontitis. *Periodontology 2000*, 35(1), 101–134. <http://doi.org/10.1111/j.0906-6713.2004.003559.x>
- OMS. (2006). Food and Agriculture Organization of the United Nations. *World Health Organization Probiotics in Food Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation Rome Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization*.
- Page, R. C., & Schroeder, H. E. (1976). Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 34(3), 235–249.
- Polson, A. M., & Goodson, J. M. (1985). Periodontal Diagnosis: Current Status and Future Needs. *Journal of Periodontology*, 56(1), 25–34. <http://doi.org/10.1902/jop.1985.56.1.25>
- Purunaik, S., Thippeswamy, H. M., & Chavan, S. S. (2014). To evaluate the effect of probiotic mouthrinse on plaque and gingivitis among 15-16 year old school children of Mysore City, India-randomized controlled trial. *Glob J Med Res*.



- Riccia, Della, D. N., Bizzini, F., Perilli, M. G., Polimeni, A., Trinchieri, V., Amicosante, G., & Cifone, M. G. (2007). Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. *Oral Diseases*, 13(4), 376–385. <http://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2006.01291.x>
- Roberfroid, M. B. (2000). A European consensus of scientific concepts of functional foods. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 16(7-8), 689–691.
- Rodríguez, G., Ruiz, B., Faleiros, S., Vistoso, A., Marró, M. L., Sánchez, J., et al. (2016). Probiotic Compared with Standard Milk for High-caries Children: A Cluster Randomized Trial. *Journal of Dental Research*, 95(4), 402–407. <http://doi.org/10.1177/0022034515623935>
- Saha, S., Tomaro-Duchesneau, C., Tabrizian, M., & Prakash, S. (2012). Probiotics as oral health biotherapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12(9), 1207–1220. <http://doi.org/10.1517/14712598.2012.693474>
- Sanz, M., Bäumer, A., Buduneli, N., Dommisch, H., Farina, R., Kononen, E., et al. (2015). Effect of professional mechanical plaque removal on secondary prevention of periodontitis and the complications of gingival and periodontal preventive measures: consensus report of group 4 of the 11th European Workshop on Periodontology on effective prevention of periodontal and peri-implant diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 42 Suppl 16, S214–20. <http://doi.org/10.1111/jcpe.12367>
- Schlagenhauf, U., Jakob, L., Eigenthaler, M., Segerer, S., Jockel-Schneider, Y., & Rehn, M. (2016). Regular consumption of *Lactobacillus reuteri*-containing lozenges reduces pregnancy gingivitis: an RCT. *Journal of Clinical Periodontology*, 43(11), 948–954. <http://doi.org/10.1111/jcpe.12606>
- Sculean, A., Schwarz, F., Berakdar, M., Romanos, G. E., Brecx, M., Willershausen, B., & Becker, J. (2004). Non-surgical periodontal treatment with a new ultrasonic device (Vectorm-ultrasonic system) or hand instruments. A prospective, controlled clinical study. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(6), 428–433. <http://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2004.00496.x>
- Sebastián Domingo, J. J., & Sánchez Sánchez, C. (2018). From the intestinal flora to the microbiome. *Revista Espanola De Enfermedades Digestivas : Organo Oficial De La Sociedad Espanola De Patologia Digestiva*, 110(1), 51–56. <http://doi.org/10.17235/reed.2017.4947/2017>

- Segers, M. E., & Lebeer, S. (2014). Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG--host interactions. *Microbial Cell Factories*, 13 Suppl 1(Suppl 1), S7. <http://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S7>
- Serrano, J., Sanz, M., Iniesta, M., & Herrera, D. (2008). Análisis de los factores de virulencia de los patógenos de asociación fuerte con la periodontitis: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia*. *Periodoncia Y Oseointegración*, 18, 109–115.
- Shimauchi, H., Mayanagi, G., Nakaya, S., Minamibuchi, M., Ito, Y., Yamaki, K., & Hirata, H. (2008). Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(10), 897–905. <http://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01306.x>
- Sinkiewicz, G., Cronholm, S., Ljunggren, L., Dahlén, G., & Bratthall, G. (2010). Influence of dietary supplementation with *Lactobacillus reuteri* on the oral flora of healthy subjects. *Swedish Dental Journal*, 34(4), 197–206. Retrieved from <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=21306085&retmode=ref&cmd=prlinks>
- Slawik, S., Staufienbiel, I., Schilke, R., Nicksch, S., Weinspach, K., Stiesch, M., & Eberhard, J. (2011). Probiotics affect the clinical inflammatory parameters of experimental gingivitis in humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, 65(7), 857–863. <http://doi.org/10.1038/ejcn.2011.45>
- Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*, 28, 12–55. <http://doi.org/10.1002/0471250953>
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), 134–144.
- Sookkhee, S., Chulasiri, M., & Prachyabrued, W. (2001). Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 90(2), 172–179.
- Soto, L., & Jara, G. (2009). Diagnóstico en salud bucal de los niños de 2 y 4 años de edad que asisten a la educación preescolar en la zona norte y centro del país, Chile. *MINSAL, Departamento De Salud Bucal*.



- Soto, L., & Tapia, R. (2007). Diagnóstico Nacional de Salud Bucal de los niños de 6 años, Chile. *MINSAL, Departamento De Salud Bucal*.
- Sreenivasan, P. K., Prasad, K. V. V., & Javali, S. B. (2016). Oral health practices and prevalence of dental plaque and gingivitis among Indian adults. *Clinical and Experimental Dental Research*, 2(1), 6–17. <http://doi.org/10.1002/cre2.15>
- Staab, B., Eick, S., Knöfler, G., & Jentsch, H. (2009). The influence of a probiotic milk drink on the development of gingivitis: a pilot study. *Journal of Clinical Periodontology*, 36(10), 850–856. <http://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01459.x>
- Stamatova, I., & Meurman, J. H. (2009). Probiotics and periodontal disease. *Periodontology 2000*, 51, 141–51. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=19878473&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed\\_ResultsPanel.Pubmed\\_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=19878473&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum)
- Tanner, A., Maiden, M. F., Macuch, P. J., Murray, L. L., & Kent, R. L. (1998). Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), 85–98. <http://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1998.tb02414.x>
- Tatakis, D. N., & Trombelli, L. (2004). Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. I. Background review and rationale. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(4), 229–238. <http://doi.org/10.1111/j.1600-051x.2004.00477.x>
- Teanpaisan, R., Piwat, S., & Dahlén, G. (2011). Inhibitory effect of oral Lactobacillus against oral pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 53(4), 452–459. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03132.x>
- Tekce, M., Ince, G., Gursoy, H., Dirikan Ipci, S., Cakar, G., Kadir, T., & Yılmaz, S. (2015). Clinical and microbiological effects of probiotic lozenges in the treatment of chronic periodontitis: a 1-year follow-up study. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(4), 363–72.
- Teles, R. P., Haffajee, A. D., & Socransky, S. S. (2006). Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontology 2000*, 42, 180–218. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00192.x>

- Teles, R., Teles, F., Frias-Lopez, J., Paster, B., & Haffajee, A. (2013). Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontology 2000*, 62(1), 95–162. <http://doi.org/10.1111/prd.12010>
- Tennert, C., Fuhrmann, M., Wittmer, A., Karygianni, L., Altenburger, M. J., Pelz, K., et al. (2014). New Bacterial Composition in Primary and Persistent/Secondary Endodontic Infections with Respect to Clinical and Radiographic Findings. *Journal of Endodontics*, 40(5), 670–677. <http://doi.org/10.1016/j.joen.2013.10.005>
- Teughels, W., Durukan, A., Ozcelik, O., Pauwels, M., Quirynen, M., & Haytac, M. C. (2013). Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(11), 1025–35.
- Teughels, W., Loozen, G., & Quirynen, M. (2011). Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota? *Journal of Clinical Periodontology*, 38(S), 159–177. <http://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01665.x>
- Teughels, W., Newman, M. G., Coucke, W., Haffajee, A. D., Van Der Mei, H. C., Haake, S. K., et al. (2007). Guiding periodontal pocket recolonization: a proof of concept. *Journal of Dental Research*, 86(11), 1078–1082. Retrieved from <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=17959900&retmode=ref&cmd=prlinks>
- Toiviainen, A., Jalasvuori, H., Lahti, E., Gursoy, U., Salminen, S., Fontana, M., et al. (2015). Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 on the number of salivary mutans streptococci, amount of plaque, gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults. *Clinical Oral Investigations*, 19(1), 77–83. <http://doi.org/10.1007/s00784-014-1221-6>
- Tonetti, M. S., & Chapple, I. L. C. (2011). Biological approaches to the development of novel periodontal therapies – Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(Suppl. 1), 114–118. <http://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01675.x>



- Tonetti, M. S., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., & Sanz, M. (2015). Primary and secondary prevention of periodontal and peri-implant diseases: Introduction to, and objectives of the 11th European Workshop on Periodontology consensus conference. *Journal of Clinical Periodontology*, *42* Suppl 16, S1–4. <http://doi.org/10.1111/jcpe.12382>
- Tran, S. D., & Rudney, J. D. (1999). Improved multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, and *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(11), 3504–3508.
- Trombelli, L., Farina, R., Silva, C. O., & Tatakis, D. N. (2018). Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *Journal of Clinical Periodontology*, *45*(Suppl 20), S44–S67. <http://doi.org/10.1111/jcpe.12939>
- Twetman, S., Derawi, B., Keller, M., Ekstrand, K., Yucel-Lindberg, T., & Stecksén-Blicks, C. (2009). Short-term effect of chewing gums containing probiotic *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. *Acta Odontologica Scandinavica*, *67*(1), 19–24. <http://doi.org/10.1080/00016350802516170>
- Vicario, M., Santos, A., Violant, D., Nart, J., & Giner, L. (2013). Clinical changes in periodontal subjects with the probiotic *Lactobacillus reuteri* Prodentis: a preliminary randomized clinical trial. *Acta Odontologica Scandinavica*, *71*(3-4), 813–819. <http://doi.org/10.3109/00016357.2012.734404>
- Yanine, N., Araya, I., Brignardello-Petersen, R., Carrasco-Labra, A., González, A., Preciado, A., et al. (2013). Effects of probiotics in periodontal diseases: a systematic review. *Clinical Oral Investigations*, *17*(7), 1627–1634. <http://doi.org/10.1007/s00784-013-0990-7>
- Yli-Knuuttila, H., Snäll, J., Kari, K., & Meurman, J. H. (2006). Colonization of *Lactobacillus rhamnosus* GG in the oral cavity. *Oral Microbiology and Immunology*, *21*(2), 129–131. <http://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2006.00258.x>

## I. ANEXOS

### Anexo N°1.

#### INFORME ANÁLISIS DE CONCORDANCIA ÍNDICE KAPPA DE COHEN

	<b>Kappa</b>
Profundidad de Sondaje	0.866
Posición de encía	0.877
Nivel de Inserción Clínico	0.820
Índice de Placa	0.935
Índice de Sangrado	0.812
Índice Gingival	0.842
<b>Total (Promedio)</b>	<b>0.858</b>

## I) Profundidad de Sondaje

## Resumen de procesamiento de casos

	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Sondaje * Sondaje	978	93,3%	70	6,7%	1048	100,0%

## Sondaje\*Sondaje Tabulación cruzada

			Sondaje (2)					Total
			0	1	2	3	4	
Sondaje 0	Recuento		13	0	0	0	0	13
	% del total		1,3%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,3%
Sondaje 1	Recuento		0	252	20	1	0	273
	% del total		0,0%	25,8%	2,0%	0,1%	0,0%	27,9%
Sondaje 2	Recuento		0	23	495	17	0	535
	% del total		0,0%	2,4%	50,6%	1,7%	0,0%	54,7%
Sondaje 3	Recuento		0	0	12	129	2	143
	% del total		0,0%	0,0%	1,2%	13,2%	0,2%	14,6%
Sondaje 4	Recuento		0	1	1	2	10	14
	% del total		0,0%	0,1%	0,1%	0,2%	1,0%	1,4%
Total		Recuento	13	276	528	149	12	978
		% del total	1,3%	28,2%	54,0%	15,2%	1,2%	100,0%

## Medidas simétricas

		Valor	Error estándar	Aprox. S <sup>b</sup>	Aprox. Sig.
Medida de acuerdo	Kappa	,866 978	,014	38,274	,000

a. No se supone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que asume la hipótesis nula.

## II) Posición de encía

## Resumen de procesamiento de casos

	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Posición de encía *	978	93,3%	70	6,7%	1048	100,0%

			Posición de encía (2)					Total	
			-2	-1	0	1	2		3
Posición de encía	-2	Recuento	12	2	0	0	0	0	14
		% del total	1,2%	0,2%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,4%
	-1	Recuento	0	53	4	3	0	1	61
		% del total	0,0%	5,4%	0,4%	0,3%	0,0%	0,1%	6,2%
	0	Recuento	0	11	794	6	0	0	811
		% del total	0,0%	1,1%	81,2%	0,6%	0,0%	0,0%	82,9%
	1	Recuento	0	0	4	73	5	0	82
		% del total	0,0%	0,0%	0,4%	7,5%	0,5%	0,0%	8,4%
	2	Recuento	0	0	0	0	9	0	9
		% del total	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,9%	0,0%	0,9%
	3	Recuento	0	0	0	1	0	0	1
		% del total	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,1%
Total			12	66	802	83	14	1	978
Recuento			1,2%	6,7%	82,0%	8,5%	1,4%	0,1%	100,0%

## Medidas simétricas

		Valor	Error estándar	Aprox. S <sup>b</sup>	Aprox. Sig.
MEdida de acuerdo	Kappa	,877 978	,019	39,135	,000



- a. No se supone la hipótesis nula.  
b. Utilización del error estándar asintótico que asume la hipótesis nula.

### III) Nivel de Inserción Clínico

	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Nivel de Inserción (1) * Nivel de Inserción (2)	978	93,3%	70	6,7%	1048	100,0%

		Nivel de Inserción (2)									
		-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	Total
Nivel de Inserción (1)	-6 Recuento	1	0	1	1	0	0	0	0	0	3
	% del total	0,1%	0,0%	0,1%	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,3%
	-5 Recuento	1	1	1	0	0	0	0	0	0	3
	% del total	0,1%	0,1%	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,3%
	-4 Recuento	0	3	12	7	0	0	0	0	0	22
	% del total	0,0%	0,3%	1,2%	0,7%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	2,2%
	-3 Recuento	0	0	3	133	14	1	0	1	0	152
	% del total	0,0%	0,0%	0,3%	13,6%	1,4%	0,1%	0,0%	0,1%	0,0%	15,5%
	-2 Recuento	0	0	0	21	445	20	1	0	0	487
	% del total	0,0%	0,0%	0,0%	2,1%	45,5%	2,0%	0,1%	0,0%	0,0%	49,8%
	-1 Recuento	0	0	0	1	23	239	7	0	0	270
	% del total	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	2,4%	24,4%	0,7%	0,0%	0,0%	27,6%
	0 Recuento	0	0	0	0	0	2	27	5	0	34
	% del total	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	2,8%	0,5%	0,0%	3,5%
	1 Recuento	0	0	0	0	0	1	0	5	1	7

	% del total	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%	0,5%	0,1%	0,7%
Total	Recuento	2	4	17	163	482	263	35	11	1	978
	% del total	0,2%	0,4%	1,7%	16,7%	49,3%	26,9%	3,6%	1,1%	0,1%	100,0%

#### Medidas Simétricas

		Valor	Error estándar	Aprox. S <sup>b</sup>	Aprox. Sig.
Medida de acuerdo	Kappa	,820 978	,016	39,908	,000

a. No se supone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que asume la hipótesis nula.

#### IV) Índice de Placa Microbiana

	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Índice de Placa (1) *	978	93,3%	70	6,7%	1048	100,0%

			Índice de Placa (2)		Total
			0	1	
Índice de Placa (1)	0	Recuento	814	7	821
		% del total	83,2%	0,7%	83,9%
1	Recuento	10	147	157	
	% del total	1,0%	15,0%	16,1%	
Total Recuento			824	154	978
			84,3%	15,7%	100,0%

**Medidas Simétricas**

		Valor	Error estándar	Aprox. S <sup>b</sup>	Aprox. Sig.
Medida de acuerdo	Kappa	,935 978	,016	29,242	,000

a. No se supone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que asume la hipótesis nula.

### V) Índice de Sangrado

	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Sangrado (1) * Índice	978	93,3%	70	6,7%	1048	100,0%

			Índice Sangrado (2)		Total
			Sí	No	
Sangrado (1)	No	Recuento	602	36	638
		% del total	61,6%	3,7%	65,2%
	Sí	Recuento	45	293	338
		% del total	4,6%	30,0%	34,6%
	2	Recuento	0	2	2
		% del total	0,0%	0,2%	0,2%
Total		Recuento	647	331	978
		% del total	66,2%	33,8%	100,0%

### Medidas Simétricas

		Valor	Error estándar	Aprox. S <sup>b</sup>	Aprox. Sig.
Medida de acuerdo	Kapp	,812 978	,020	25,485	,000

a. No se supone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que asume la hipótesis nula.



## VI) Índice Gingival

	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Índice Gingival (1) * Índice Gingival (2)	628	59,9%	420	40,1%	1048	100,0%

	Índice Gingival (2)			Total	
	0	1	2		
Índice Gingival (1) 0	Recuento	227	18	3	248
	% del total	36,1%	2,9%	0,5%	39,5%
1	Recuento	17	249	8	274
	% del total	2,7%	39,6%	1,3%	43,6%
2	Recuento	4	12	90	106
	% del total	0,6%	1,9%	14,3%	16,9%
Total Recuento		248	279	101	628
		39,5%	44,4%	16,1%	100,0%

### Medidas Simétricas

		Valor	Error estándar	Aprox. S <sup>b</sup>	Aprox. Sig.
Medida de acuerdo	Kap	,842 628	,019	28,259	,000

a. No se supone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que asume la hipótesis nula.

## Anexo N°2

FICHA CLINICA SALUD PERIODONTAL										
Día Mes Año			Examinador			Número de cuestionario				
<input type="text"/>			<input type="text"/>			<input type="text"/>				
Grupo		Adolescente	<input type="checkbox"/>	Sano	<input type="text"/>	Tipo de Intervención		<input type="text"/>		
				Gingivitis	<input type="text"/>					
		Adulto	<input type="checkbox"/>	Sano	<input type="text"/>					
				Periodontitis	<input type="text"/>					
INFORMACIÓN GENERAL										
Nombre <input type="text"/>										
Rut: <input type="text"/>										
Fecha Nacimiento:			Día Mes Año							
<input type="text"/>			<input type="text"/>							
Edad en Años			<input type="text"/>			Teléfono		C. Área		Número
						<input type="text"/>		<input type="text"/>		<input type="text"/>
Sexo		0 mujer		<input type="text"/>						
		1 hombre								

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA									
1. Número de dientes perdidos:		<input type="text"/>							
Motivo de la pérdida de dientes:				Por caries					
				Por caries					
				Por sueltos					
				Por indicación de ortodoncia					
2. Tratamiento previo de ortodoncia:		<input type="checkbox"/>							
No:		0							
Si:		1							
3. Uso de piercing en labios o lengua:		<input type="checkbox"/>		Ubicación <input type="text"/>					
No:		0							
Si:		1							
4. Biotipo de encía		<input type="checkbox"/>							
Fino:		1							
Grueso:		2							



INDICE GINGIVAL	
Maxilar Superior	
17	
16	
15	
14	
13	
12	
11	
21	
22	
23	
24	
25	
26	
27	
Vestibular	
Mesial	
Palatino	
Distal	

Maxilar Inferior	
47	
46	
45	
44	
43	
42	
41	
31	
32	
33	
34	
35	
36	
37	
Vestibular	
Mesial	
Lingual	
Distal	



## Anexo N°3



UNIVERSIDAD DE CHILE  
Facultad de Odontología – Departamento de Odontología Conservadora  
Ed: 12/09/2012

Facultad de Odontología  
Universidad de Chile

Proyecto de Investigación Fondecyt  
Académico Responsable: Jorge Gamonal

### CONSENTIMIENTO INFORMADO – PADRES O APODERADOS

#### Antecedentes Generales

Su hijo o pupilo ha sido invitado a participar voluntariamente en un estudio patrocinado por Fondecyt Regular, titulado "Efecto clínico y microbiológico de Lactobacilos Rhamnosus adjunto a la terapia periodontal convencional en pacientes adolescentes con gingivitis". Estas enfermedades periodontales (gingivitis y periodontitis) corresponde a una infección de los tejidos alrededor del diente y con el tiempo y sin tratamiento puede generar una lesión destructiva en los tejidos que rodean la raíz del diente.

El tratamiento de estas lesiones es la eliminación de la placa bacteriana acumulada alrededor del diente, con el objetivo de eliminar la infección y evitar las complicaciones asociadas a esta enfermedad.

En términos generales, el objetivo del presente estudio es caracterizar la presencia de las bacterias localizadas alrededor del diente y conocer la presencia de algunos indicadores de la respuesta defensiva del sujeto, como la detección de ciertos mediadores involucrados en inflamación.

Con este fin se incluirán adolescentes con gingivitis (enfermedad en estudio) y otros adolescentes sanos, en los que además del tratamiento periodontal de eliminar la placa bacteriana, el tártaro presente y efectuar la enseñanza de técnica de cepillado, se procederá a tomar muestras biológicas de la placa bacteriana y del fluido gingival crevicular. En el presente estudio habrá un grupo placebo, y las personas afectadas por gingivitis o periodontitis recibirán tratamiento estándar o experimental con probióticos.

Este formulario será explicado por el investigador y se entregará a los participantes para su lectura. El participante podrá retirarse del estudio en cualquier momento que lo desee y sus datos serán eliminados a partir de ese momento.

#### Procedimiento de toma de las muestras

Se incluirán pacientes con diagnóstico de gingivitis y controles sin la enfermedad, que no presenten enfermedades generales. Una vez realizado el diagnóstico se tomarán las muestras biológicas (mediante un cono de papel y una tira de papel absorbente en la unión de la encía con el diente) al inicio del estudio, luego a los 6 y 12 meses.

Durante el tratamiento, en forma aleatoria se designará que grupo de pacientes estará usando probióticos (microorganismos vivos que al ingerirse ejercen efectos benéficos para la salud) durante 6 meses y que grupo de pacientes estará sin usar probióticos.

La duración del estudio será, por tanto de un año en pacientes que se realicen tratamiento periodontal. El financiamiento del tratamiento será responsabilidad del estudio, y los análisis de muestras serán financiados por el proyecto, así como el estudio radiográfico requerido para éste.

El total de muestras y datos obtenidos serán registrados e identificados por el investigador responsable mediante códigos para su utilización exclusiva en el desarrollo del presente estudio. Los datos personales e identificación de los sujetos participantes serán

Dpto. de Odontología Conservadora/Olivos N°943, Independencia ☎: 9781839/Casilla 9105





UNIVERSIDAD DE CHILE  
Facultad de Odontología – Departamento de Odontología Conservadora  
Ed: 12/09/2012

confidenciales y se utilizarán códigos para mantener oculta la identidad de los participantes. En caso de manifestar interés en los resultados de los análisis efectuados, los interesados pueden acceder a esta información solicitándola al investigador responsable. Los sujetos participantes pueden retirarse del estudio en cualquier momento que estimen conveniente, sin perjuicio de su tratamiento odontológico. En este caso, sólo se estudiarán las muestras obtenidas con anterioridad al retiro del sujeto.

Los pacientes que luego de ingresar al estudio manifiesten después del análisis clínico que no han obtenido la mejoría deseada, serán atendidos profesionalmente sin costo alguno por los profesionales integrantes del proyecto de investigación.

#### Beneficios de participar en el estudio

Como ventaja de participar en el presente estudio, a todos los pacientes participantes del mismo se les hará entrega de todos los elementos necesarios para la higiene bucal (cepillo dentario, cepillo interproximal, seda y enjuagatorios).

Otra ventaja es que se les dará a conocer y se consignará en su ficha clínica los resultados de los análisis que resultan de las muestras biológicas tomadas a los pacientes.

En relación con el tratamiento periodontal, en el tratamiento realizado por el suscrito, se hará una rebaja de un 50% del arancel que la Facultad tiene dispuesto cobrar para tales efectos.

#### Riesgos de participar el estudio

La desventaja de participar en el presente estudio, es que los pacientes seleccionados serán sometidos a la toma muestra de placa bacteriana y de fluido gingival crevicular (que no requiere anestesia, y es inocua para el paciente)

En caso de alguna dificultad, los teléfonos de contacto del investigador responsable: Jorge Gamonal, son: 9781839, 9781838, y 2324232

En la situación de tener un imprevisto gastrointestinal por el uso de probióticos, contactarse con el Investigador Principal, quién derivará inmediatamente al Dr. José Manuel Manríquez, integrante del presente proyecto de investigación.

Se señala además, que en el presente estudio no hay retribución económica.



Dpto. de Odontología Conservadora/Olivos N°943, Independencia ☎: 9781839/Casilla 1903



UNIVERSIDAD DE CHILE  
 Facultad de Odontología – Departamento de Odontología Conservadora  
 Ed: 12/09/2012

### FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Declaro haber comprendido las explicaciones que se me han facilitado, en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo me ha permitido realizar todas las observaciones y preguntas necesarias, resolviéndome todas las dudas que le he planteado, señalándome además que habrá absoluta confidencialidad en los datos por mi entregados.

También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación alguna puedo revocar el consentimiento que ahora presto para participar en el presente Proyecto de Investigación, y que frente a cualquier duda puedo además consultar con el Presidente del Comité de Ética de la Facultad de Odontología, Dr. Juan Cortés, en el fono: 9781701.

Además se me ha aclarado, que en caso de no dar mi consentimiento, el profesional procederá de todas maneras a realizar el mencionado tratamiento periodontal.

Identificación Paciente

Nombre: \_\_\_\_\_

Identificación Tutor o Padre del participante

Nombre \_\_\_\_\_

Fono \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Identificación del inv que toma el CI

Nombre: \_\_\_\_\_

Fono \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Identificación Inv. Resp.

Nombre: \_\_\_\_\_

Fono \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_



Dpto. de Odontología Conservadora/Olivos N°943, Independencia ☎ : 9781839/Casilla 1903





UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Odontología – Departamento de Odontología Conservadora

Facultad de Odontología  
Universidad de ChileProyecto de Investigación  
Académico Responsable: Jorge Gamonal

## Asentimiento Informado - Adolescentes

## Antecedentes Generales

Usted ha sido invitado a participar voluntariamente en un estudio patrocinado por Fondecyt Regular, titulado "Efecto clínico y microbiológico de Lactobacillus Rhamnosus adjunto a la Terapia periodontal convencional en pacientes adolescentes con gingivitis".

Las enfermedades periodontales (gingivitis y periodontitis corresponden a una infección de los tejidos alrededor del diente y con el tiempo y sin tratamiento puede generar una lesión destructiva en los tejidos que rodean la raíz del diente. El tratamiento de estas lesiones es la eliminación de la placa bacteriana acumulada alrededor del diente, con el objetivo de eliminar la infección y evitar las complicaciones asociadas a esta enfermedad.

En términos generales, el objetivo del presente estudio es caracterizar la presencia de las bacterias localizadas alrededor del diente y conocer si el probiótico como adjunto al tratamiento periodontal convencional mejora la respuesta de los tejidos periodontales.

Con este fin se incluirán adolescentes con gingivitis (enfermedad en estudio) en los que además del tratamiento periodontal de eliminar la placa bacteriana, el tártaro presente y efectuar la enseñanza de técnica de cepillado, se procederá a tomar muestras biológicas de la placa bacteriana y del fluido gingival crevicular.

Este formulario será explicado por el investigador y se entregará a los participantes para su lectura. El participante podrá retirarse del estudio en cualquier momento que lo desee y sus datos serán eliminados a partir de ese momento.

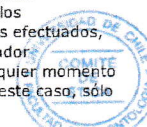
## Procedimiento toma de las muestras

Se incluirán pacientes con diagnóstico de gingivitis, que no presenten enfermedades generales. Una vez realizado el diagnóstico se tomarán las muestras biológicas (mediante un cono de papel y una tira de papel absorbente en el surco gingival) al inicio del estudio, luego a los 6 y 12 meses.

Durante el tratamiento en forma aleatoria se designará qué grupo de pacientes estará usando probióticos durante 3 meses y qué grupo de pacientes estará sin usar probióticos.

El financiamiento del tratamiento será responsabilidad del estudio, y los análisis de muestras serán financiados por el proyecto, así como el estudio radiográfico si fuese requerido para éste.

El total de muestras y datos obtenidos serán registrados e identificados por el investigador responsable mediante códigos para su utilización exclusiva en el desarrollo del presente estudio. Los datos personales e identificación de los sujetos participantes serán confidenciales y se utilizarán códigos para mantener oculta la identidad de los participantes. En caso de manifestar interés en los resultados de los análisis efectuados, los interesados pueden acceder a esta información solicitándola al investigador responsable. Los sujetos participantes pueden retirarse del estudio en cualquier momento que estimen conveniente, sin perjuicio de su tratamiento odontológico. En este caso, sólo se estudiarán las muestras obtenidas con anterioridad al retiro del sujeto.



Dpto. de Odontología Conservadora/Olivos N°943, Independencia ☎: 9781839/Casilla 1903





UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Odontología – Departamento de Odontología Conservadora

**Beneficios de participar en el estudio**

Como ventaja de participar en el presente estudio, a todos los pacientes participantes del mismo se les hará entrega de todos los elementos necesarios para la higiene bucal (cepillo dentario, cepillo interproximal, seda y enjuagatorios).

Otra ventaja es que se les dará a conocer y se consignará en su ficha clínica los resultados de los análisis que resultan de las muestras biológicas tomadas a los pacientes.

En relación con el tratamiento periodontal, en el tratamiento realizado por el suscrito, se hará una rebaja de un 50% del arancel que la Facultad tiene dispuesto cobrar para tales efectos.

**Riesgo de participar el estudio**

La desventaja de participar en el presente estudio, es que los pacientes seleccionados serán sometidos a la toma de una muestra de placa bacteriana y de fluido gingival crevicular (que no requiere anestesia, y es inocua para el paciente).

En caso de alguna dificultad, los teléfonos de contacto del investigador responsable: Jorge Gamonal, son: 9781702, 9785047.

En la situación de tener un imprevisto gastrointestinal por el uso de probióticos, contactarse con el Investigador Principal, quién derivará inmediatamente al Dr. José Manuel Manríquez, integrante del presente proyecto de investigación.

Se señala además que en el presente estudio no hay retribución económica.

**Declaro**

Haber comprendido las explicaciones que se me han facilitado, en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo me ha permitido realizar todas las observaciones y preguntas necesarias, resolviéndome todas las dudas que le he planteado, señalándome además que habrá absoluta confidencialidad en los datos por mí entregados.

También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación alguna puedo revocar el consentimiento que ahora presto para participar en el presente Proyecto de Investigación, y que frente a cualquier duda puedo además consultar con el Presidente del Comité de Ética de la Facultad de Odontología, Dr. Juan Cortes, en el fono: 9781701.

Además se me ha aclarado, que en caso de no dar mi asentimiento, el profesional procederá de todas maneras a realizar el mencionado tratamiento periodontal.

**Identificación Paciente**

Nombre:

Rut:

Fono:

Firma

Fecha:

Fecha de Edición: 19.08.2012

**Identificación Inv. Resp.**

Nombre:

Rut:

Fono:

Firma

**Testigo**

Nombre:

Rut:

Fono:

Firma



Dpto. de Odontología Conservadora/Olivos N°943, Independencia ☎ : 9781839/Casilla 1903