



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESTUDIO LONGITUDINAL DE LA MICROBIOTA  
SUBGINGIVAL DE UN PACIENTE CON PERIODONTITIS  
BAJO EL TRATAMIENTO DE *Lactobacillus reuteri*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A   D E N T I S T A

P R E S E N T A:

CLAUDIA SALINAS AZUCENO

TUTOR: Dra. ADRIANA PATRICIA RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

ASESOR: Dra. LAURIE ANN XIMÉNEZ FYVIE



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
Antecedentes.....	5
Etiología de las enfermedades periodontales .....	5
<i>Generalidades</i> .....	5
<i>Gingivitis y periodontitis</i> .....	6
<i>Biopelícula subgingival</i> .....	8
<i>Técnica de Checkerboard para hibridación DNA-DNA</i> .....	12
Probióticos .....	13
<i>Historia y concepto</i> .....	13
<i>Mecanismo de acción de los probióticos</i> .....	15
<i>Efectos en la cavidad oral</i> .....	15
<i>Uso de probióticos en caries dental</i> .....	16
Tratamiento a base de probióticos de las enfermedades periodontales .....	17
<i>Características del probiótico Lactobacillus reuteri</i> .....	20
<i>ProbucaI-D® BIOGAIA</i> .....	20
<b>PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA</b> .....	<b>22</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>24</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
General .....	24
Particulares.....	24



<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
Diseño experimental .....	26
Sujeto de estudio.....	27
Criterios de selección.....	27
Evaluación clínica.....	28
Evaluación microbiológica .....	29
Recolección y procesamiento de muestras .....	29
Especies bacterianas y condiciones de cultivo para “Checkerboard”	30
Purificación de DNA y preparación de sondas.....	31
Hibridaciones DNA-DNA. ....	32
Detección y cuantificación de microorganismo.....	33
Análisis estadístico de datos.....	34
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
EVALUACIÓN CLÍNICA .....	36
Características del sujeto de estudio.....	36
Características periodontales.....	37
EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA .....	38
Niveles promedio.....	38
Prevalencia promedio.....	40
Proporción promedio .....	41
Evaluación microbiológica del diente 46 .....	44



<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>45</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>53</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>
<b>TABLAS.....</b>	<b>61</b>
<b>FIGURAS.....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO 1. CONSTANCIA DE PARTICIPACIÓN EN LA INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR DENTAL RESEARCH, DIVISIÓN MEXICANA.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO 2. FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO 3. REPORTE DE RESULTADOS DE CUSO DE CALIBRACIÓN DE CLÍNICOS .....</b>	<b>90</b>



## RESUMEN

**Introducción.** Empresas farmacéuticas tienen a la venta probióticos a base de *Lactobacillus* sp. como coadyuvante para el tratamiento de enfermedades periodontales, sin embargo, los cambios en la microbiota subgingival con dichos tratamientos han sido pobremente evaluados. **Objetivo.** Describir la microbiota subgingival de un paciente con periodontitis crónica y comparar los cambios microbiológicos a través de un estudio longitudinal, bajo el tratamiento del probiótico a base de *Lactobacillus reuteri* (ProbucaL-D®BioGaia) por medio de la técnica de Checkerboard. **Materiales y métodos.** A una paciente seleccionada con Periodontitis Crónica (PC) se le indicó el uso del probiótico por 30 días, después del cepillado matutino y vespertino. Se realizó evaluación periodontal y microbiológica previo al tratamiento (Tiempo-0=T0) y en tiempos de 1, 3 y 12 meses (T1, T3 y T12). Los parámetros evaluados en cada visita fueron: acumulación de placa, enrojecimiento gingival, sangrado al sondeo, supuración, profundidad de bolsa y nivel de inserción (6-sitios/diente). Las muestras de placa subgingival fueron procesadas para determinar: niveles, prevalencia y proporción de 40 especies por medio de la técnica de Checkerboard para hibridaciones DNA-DNA. **Resultados.** 16 de las 40 especies evaluadas presentaron menores cuentas y proporciones en T1: *Parvimonas micra* (cuentas<sub>p</sub><0.01, proporción<sub>p</sub><0.05) y *Streptococcus gordonii* (proporción<sub>p</sub><0.05); en T3: *Fusobacterium periodonticum* (cuentas<sub>p</sub><0.001) y en T12: (cuentas<sub>p</sub><0.001, proporción<sub>p</sub><0.01) en comparación con el T0. A partir del T3: *Treponema denticola* (cuentas y proporción<sub>p</sub><0.05),

*Campylobacter showae* (cuentas\_ $p$ <0.05, proporción\_ $p$ <0.01) y *Actinomyces odontolyticus* (cuentas\_ $p$ <0.01, proporción\_ $p$ <0.001) tuvieron porcentajes mayores de cuentas y proporción que los que tuvieron en T0. **Conclusión.** Bajo el tratamiento del probiótico a base de *L. reuteri*, se mantuvieron menores cuentas y proporción en el 40% de las cepas evaluadas en el paciente con PC. Se sugiere efectividad antibacteriana moderada y temporal del probiótico, ya que la microbiota periodontopatógica se restituyó posterior a los tres meses del tratamiento.

Trabajo presentado en International Association for Dental Research (IADR, división mexicana, Cancún Quintana Roo, 2019) <http://www.iadr.org.mx/otros-congresos.php> (anexo 1).

## **AGRADECIMIENTOS**

Principalmente a Dios y Cristo, por la fortaleza que me brindaron en los tiempos en los cuales me faltaban ganas de seguir adelante, por no soltar mi mano y siempre guiarme y ponerme a las personas indicadas en mi vida, sin ellos no podría haberlo logrado.

A mi papá Gerardo, quien a lo largo de este tiempo me ha apoyado y me ha enseñado que no importa la adversidad que tengamos, siempre podemos salir adelante y más con el amor y apoyo de la familia. Eres mi gran ejemplo, sin ti no estaría donde estoy, gracias por siempre alentarme, ayudarme y por siempre estar para nosotros.

A mi mamá Flor, quien siempre busco la manera de sacarnos a delante, por todo el apoyo y amor que me diste, gracias porque sin ti tampoco estaría donde estoy. Eres una parte fundamental en todo esto.

A Mayo por siempre preocuparte por mí, por apoyarme y a ayudarme a ver mis errores, por enseñarme a tener valor de cambiar de estilo de vida, que no importa nada solo las ganas de querer cambiar. Gracias por siempre estar para nosotros, te amo eres parte fundamental de todo esto y es para mí un gran honor que formes parte de mi vida.

A Chapis, por escucharme, alentarme y ayudarme, gracias por formar parte de esto que estoy logrando. Gracias por compartir esa fortaleza que tienes conmigo.



A mis hermanas, Bere, Kar y Jaz con quienes he compartido muchas cosas, desde alegrías y tristeza, son parte fundamental en mi vida sin ustedes estaría perdida, gracias por enseñarme esa fortaleza que las caracteriza como seres humanos, de ustedes aprendí a tener perseverancia, paciencia y a no darme por vencida. Son de gran bendición en mi vida. A mis sobrinos Molcas, Diego y Carlo por ser un motor en mi vida.

A mi mami Maya y mi mami Alí, por sus cuidados y amor, siempre estarán en mi corazón, las extraño mucho, pero con gran alegría les digo lo logre, gracias por todo.

A los amigos que hice en el proceso de estar en el laboratorio de genética molecular, Jimena, Erika y Lety por su apoyo y amistad que me brindaron, gracias por apoyarme en cada etapa que pasé.

Dra. Adriana o para los más cercanos Paty, gracias por creer en mí y en este proyecto, porque sin usted no se hubiera podido realizar, por enseñarme lo que sabe en investigación, la fortaleza que la caracteriza y sobre todo gracias por ser paciente conmigo, en usted no solo encontré una tutora sino un ser humano con un alma bondadosa, gracias por brindarme su amistad.

Dra. Laurie por aceptarme en el laboratorio con este proyecto, espero poder aprender más con usted, gracias por enseñarme una fortaleza de espíritu que usted tiene, a no desistir a pesar de los malos momentos y tener una sonrisa en todo momento.

A Sergio y Elías por ser parte de mi vida, por el apoyo, la paciencia y ser los acompañantes en este proyecto de vida, los amo.

# INTRODUCCIÓN

## ANTECEDENTES

### Etiología de las enfermedades periodontales

#### *Generalidades*

Las enfermedades periodontales se definen como infecciones endógenas mixtas que estimulan respuestas inmunológicas destructivas, conduciendo a la pérdida de los tejidos de soporte del diente, causadas por la disbiosis de la biopelícula <sup>1, 2</sup>. Si hablamos propiamente de gingivitis, nos referimos al principal cuadro patológico seguido de la periodontitis; la cual es el resultado de la inflamación gingival causada por la acumulación de microorganismos, la respuesta inflamatoria puede resistir varios años sin destrucción del ligamento periodontal o evidencia de pérdida ósea <sup>3</sup>.

La clasificación del desarrollo de la gingivitis es la lesión inicial, temprana, establecida y avanzada. El inicio de la periodontitis se da cuando la lesión inicial progresa a lesión establecida o llamada progresiva <sup>2</sup>. Se considera que la periodontitis comienza como una gingivitis inducida por placa dentobacteriana, lesión que es reversible y que si no es tratada evolucionará a una periodontitis (**figura 1**) <sup>4</sup>. En los parámetros clínicos de periodontitis, se observa destrucción tisular y pérdida ósea en grados variables, dependiendo del tipo de ritmo de progresión de la enfermedad, pérdida de la inserción, bolsas periodontales >3 mm y en ocasiones presencia de sangrado y/o supuración <sup>2</sup>.

La clasificación del desarrollo de la gingivitis es la lesión inicial, temprana, establecida y avanzada. El inicio de la periodontitis se da cuando la lesión inicial progresa

a lesión establecida o llamada progresiva <sup>2</sup>. Se considera que la periodontitis comienza como una gingivitis inducida por placa dentobacteriana, lesión que es reversible y que si no es tratada evolucionará a una periodontitis (**figura 1**) <sup>4</sup>. En los parámetros clínicos de periodontitis, se observa destrucción tisular y pérdida ósea en grados variables, dependiendo del tipo de ritmo de progresión de la enfermedad, pérdida de la inserción, bolsas periodontales >3 mm y en ocasiones presencia de sangrado y/o supuración <sup>2</sup>.

### ***Gingivitis y periodontitis***

La clasificación más actual de las enfermedades y condiciones periodontales, establecida por la Academia Americana de Periodontología y la Federación Europea de Periodontología, clasifica a las enfermedades periodontales y/o condiciones periodontales, de acuerdo con los conocimientos actuales de fisiopatología. Define a la salud periodontal como: la ausencia clínica detectable de la inflamación, en el cual hay una homeostasis entre el sistema inmune y la salud gingival clínica. La salud periodontal, se puede encontrar en un periodonto intacto sin pérdida de la inserción clínica o pérdida ósea, en un periodonto reducido, en pacientes sin compromiso periodontal, o en pacientes con una historia de periodontitis, la cual se encuentra estable periodontalmente<sup>5</sup>. Por otro lado, hay dos categorías para las enfermedades gingivales: las inducidas por placa dental y las no inducidas por placa dental, donde el término "gingivitis" se aplica solo a la gingivitis inducida por placa dental, en lugar de las formas de gingivitis no inducidas por la biopelícula <sup>5</sup> **figura 1**.

Las formas de periodontitis crónica o agresiva de la clasificación de Armitage de 1999 dejan de referirse así. En la clasificación de 2018, se clasifica en 3 tipos de periodontitis <sup>1</sup>:

1. Enfermedad periodontal necrozante:
  - a. Gingivitis necrozante
  - b. Periodontitis necrozante
  - c. Estomatitis necrozante
2. Periodontitis como manifestación por enfermedades sistémicas: la clasificación de estas condiciones basa en el sistema primario de enfermedades sistémicas de acuerdo con su clasificación internacional estadística de los códigos de las enfermedades relacionadas con problemas de salud (ICD).
3. Periodontitis:
  - a. Estadio: basado en la severidad <sup>a</sup> y complejo del manejo <sup>b</sup>

Estadio I: periodontitis inicial

Estadio II: periodontitis moderada

Estadio III: periodontitis severa con potencial adicional a pérdida dental.

Estadio IV: periodontitis severa con potencial de la pérdida de la dentición.

- b. Extensión y distribución <sup>c</sup>: localizada, generalizada; distribución molar/incisivos.
- c. Grados: evidencia o riesgo de progresión <sup>d</sup>, respuesta anticipada a tratamiento <sup>e</sup>.
  - i. Grado A: tasa de progresión baja.
  - ii. Grado B: tasa de progresión moderada.
  - iii. Grado C: tasa rápida de progresión.

a) Severidad: nivel de inserción clínico interdental (CAL) y sitios con gran pérdida, radiográficamente pérdida de hueso y dental. b) Complejidad del manejo: Profundidad del sondeo, patrón de pérdida ósea, lesión de furca, número de dientes remanentes, movilidad dental, defectos del reborde alveolar y disfunciones de la masticación. c) Descripción del estadio: localizada < 30%, generalizada ≥30% de los dientes. d) Riesgo de progresión: evidencia directa de radiografías o pérdida del nivel de inserción clínica o indirecta (proporción pérdida ósea/edad). e) Respuesta anticipada al tratamiento: caso de fenotipo, fumador, hiperglicemia <sup>6</sup>.

### ***Biopelícula subgingival.***

La cavidad bucal alberga un ecosistema compuesto por más de 700 especies bacterianas que interactúan entre ellas y el hospedero, más de 400 especies se encuentran en la bolsa periodontal, que es la profundización patológica del surco gingival, con migración apical del epitelio de unión <sup>2</sup>. Las interacciones bacterianas se dan gracias a la formación de una biopelícula adherida a la superficie natural de los dientes, la cual es la formación de coagregados bacterianos, que existen como

comunidades cercanamente asociadas y se adhieren a una variedad de superficies naturales y artificiales, en un medio acuoso que contiene una concentración suficiente de nutrientes para sostener las necesidades metabólicas de la microbiota <sup>7</sup>.

La coagregación bacteriana es una de las características principales de la estructura de la biopelícula dental conocido en inglés como “Biofilm” donde se unen especies bacterianas organizadas, lo cual les permite vivir en una comunidad en la cual existen especies bacterianas que producen factores de crecimiento que requieren otras bacterias, dependiendo unas de otras y así poder sobrevivir <sup>7</sup>.

Los complejos bacterianos de la placa subgingival son una representación de las asociaciones entre especies bacterianas que forman la placa dentobacteriana subgingival (**figura 2**) <sup>8</sup> se pueden distribuir las especies en:

- Complejo de *Actinomyces*: especies de *Actinomyces* exceptuando *Actinomyces odontolyticus*.
- Complejo amarillo: *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguinis*.
- Complejo morado: *A. odontolyticus* y *Veillonella parvula*.
- Complejo verde: *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Campylobacter concisus*.
- Complejo naranja: *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Parvimonas micra*,

*Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus constellatus* y *Eubacterium nodatum*.

- Complejo rojo: *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Porphyromonas gingivalis*.
- Especies no agrupadas: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sp. b y *Selenomonas noxia*.

En los complejos de *Actinomyces* y *Streptococcus* se agrupan especies que colonizan la placa dentobacteriana en etapas tempranas después de una limpieza profesional y en su mayoría son consideradas como periodonto benéficas o especies compatibles con la salud periodontal. En la primera etapa de la formación de biopelícula dentobacteriana se da una adsorción de proteínas salivales, formando una película condicionante conocida como película adquirida. La colonización primaria se da por bacterias facultativas, principalmente Gram positivas las cuales se adhieren selectivamente a la superficie dental. La segunda etapa de la formación de la biopelícula se da por un mecanismo denominado coagregación, dando una diversificación de la composición de la biopelícula debido a las adhesinas de la superficie celular. Se coagregan y multiplican cocos y bacilos Gram positivos y Gram negativos, un ejemplo son los complejos bacterianos verde y morado considerados como colonizadores tempranos de la biopelícula dentobacteriana. En la tercera etapa, los receptores superficiales de microorganismos permiten la posterior coagregación de especies Gram negativas que tienen poca capacidad para adherirse directamente a la superficie dental

como son *F. nucleatum*, *P. intermedia* y *Corynebacterium matruchotii*, conocidos como colonizadores puente o patógenos putativos del complejo naranja <sup>8,9</sup>.

La heterogeneidad de la biopelícula dental aumenta con el tiempo junto con la maduración de las microcolonias, ocurre debido a la yuxtaposición y función de la biopelícula dental, induciendo a nuevos patrones de expresión genética bacteriana como son la conjugación y la transformación, las interacciones se dan por la proximidad de diferentes especies. Gracias a esto, un mayor número de bacterias anaerobias estrictas Gram negativas tales como *T. forsythia*, *P. gingivalis* y *T. denticola* colonizan en estadios tardíos del desarrollo de la placa dentobacteriana, contribuyen a la patogenicidad de la biopelícula<sup>10</sup>. Estos colonizadores incluyen al complejo rojo, que son periodontopatógenos reconocidos, mismas que no presentan interacciones de coagregación significativas como los colonizadores tempranos <sup>8,9</sup>.

La biopelícula dental se asocia con las enfermedades periodontales debido a un grupo característico relativamente definido como patógenos periodontales, actuando en combinación sinérgica; dentro de las cuales se incluyen a *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *P. gingivalis* y *T. denticola*. El desequilibrio ecológico tanto en la población mexicana como en otras poblaciones del mundo consiste básicamente en el aumento de especies periodontopatógenas y la disminución en especies compatibles con salud periodontal en sujetos sanos en comparación con sujetos con periodontitis (**figura 3**)<sup>11</sup>,<sup>12</sup>. Desde el punto de vista etiológico, se consideran ciertos factores que van a determinar la enfermedad y la severidad en un individuo esto incluye: susceptibilidad del huésped;



presencia de bacterias patógenas y reducción o ausencia de las llamadas especies benéficas. Se han establecido de manera universal, perfiles microbiológicos subgingivales para la salud periodontal y periodontitis crónica generalizada, las diferencias en la microbiota subgingival entre poblaciones puede presentar ciertas particularidades, con la finalidad de establecer tratamientos periodontales específicos <sup>13,</sup>  
<sup>14.</sup>

En la descripción de la microbiota subgingival de sujetos mexicanos sanos periodontalmente y con periodontitis crónica y aguda generalizada, y sin compromiso sistémico, establecieron que las especies bacterianas compatibles con la salud periodontal incluyen miembros de los géneros: *Actinomyces*, *Streptococcus* y *Veillonella*, mientras que especies de los géneros *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Treponema* y *Tannerella* fueron detectadas en mayor proporción en sujetos con periodontitis, demostrándose que no existen diferencias microbiológicas significativas entre sujetos de estudio con periodontitis crónica generalizada y periodontitis agresiva <sup>11.</sup>

### ***Técnica de Checkerboard para hibridación DNA-DNA***

Para detectar la presencia de ácidos nucleótidos de microorganismos de la cavidad oral, se utilizan técnicas moleculares como es el proceso de hibridación de sondas de ácidos nucleicos (DNA-DNA). La extracción de ácidos nucleicos depende del tipo de muestra, la cantidad de microorganismos presentes y la naturaleza del ácido nucleico, y evita la pérdida de la muestra por viabilidad celular, ya que se requiere de células lisadas para su identificación. La hibridación consiste en el apareamiento de dos cadenas

sencillas de ácidos nucleicos que sean complementarias entre sí para formar un híbrido. Se basa en la capacidad de desnaturalización y renaturalización de los ácidos nucleicos, cuando una cadena de DNA se somete a un choque térmico o cambio de pH, causando que los puentes de hidrogeno que mantienen su estructura se desnaturalizan (rompen) separando las dos cadenas complementarias entre sí, después se restablecen las condiciones de temperatura o pH con ello las hebras de DNA son capaces de volver a unirse para formar la doble cadena a lo cual se le llama renaturalización. Se desnaturaliza la diana previamente extraída, se introduce al medio de reacción, la sonda estás son sintéticas y compuestas de 20 a 50 bases, una vez formado el híbrido se detecta siguiendo el formato de revelado inmunológico que determina el sistema de marcaje empleado en la sonda (enzimas, radioisótopos fluorocromo o antígeno). Checkerboard DNA-DNA es un proceso usado para determinar la abundancia de un microorganismo en particular de una muestra <sup>15</sup>.

## **Probióticos**

### ***Historia y concepto***

El consumo de microorganismos que promueven la salud data de la antigua Roma, donde se menciona que el uso de alimentos fermentados con microorganismos fue utilizado como agentes terapéuticos. Plinio Segundo escribió que los productos de la leche fermentada podrían ser beneficiosos para la microbiota estomacal <sup>16</sup>. El microbiólogo ucraniano Eli Metchnikoff, ganador del Premio Nobel de la Ciencia en 1907, trabajando en el Instituto Pasteur, estableció los fundamentos científicos de los

probióticos, que hasta la actualidad tienen alcance hasta la cavidad oral <sup>17, 18</sup>. Metchnikoff propone en su libro “The Prolongation of life”, que la ingesta de probióticos como *Lactobacillus bulgaricus* es capaz de desplazar la microbiota patógena intestinal gracias al ácido láctico <sup>19</sup>. En 1965 Lily y Stilwell introducen el término probióticos como “una sustancia producida por los microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos” <sup>20</sup> de aquí en adelante se han dado diversas definiciones <sup>21</sup>. Entre ellas, la más actual de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se definen como “microorganismos vivos que al ser administrados en dosis adecuadas ejercen un efecto benéfico sobre la salud del hospedero” <sup>22, 23</sup>

La aplicación de la “bacterioprofilaxis” por medio de probióticos o terapia a base de sustitución de la microbiota bacteriana, fue discontinuada por la llegada de los antibióticos, los médicos y la población se convencieron de que las enfermedades infecciosas eran mejor tratadas con antibióticos. Sin embargo, en la actualidad no se tiene el conocimiento del tratamiento ideal para prevenir y contrarrestar infecciones endógenas de carácter mixto como son las enfermedades periodontales <sup>21</sup>. El efecto del tratamiento con probióticos ha sido estudiado extensamente y en los últimos 20 años. Ha tenido un avance selectivo y característico de cultivos bacterianos y su uso en diversas indicaciones sistémicas y desordenes médicos, se ha demostrado ampliamente los efectos beneficiosos en infecciones crónicas, entre las más relevantes colitis ulcerativa <sup>24</sup>, colon irritable <sup>25</sup>, diarrea asociada a antibiótico-terapia <sup>26</sup>, entre otras, sin embargo el efecto de los probióticos en la salud periodontal es aún limitada <sup>21, 22</sup>.

### ***Mecanismo de acción de los probióticos***

Los probióticos actúan a través de una variedad de mecanismos que incluyen:

- Exclusión y competencia de patógenos potenciales de nutrientes y células epiteliales de adhesión.
- Producción de sustancias antimicrobianas contra especies periodontopatógenas.
- Inmuno-modulación local y sistémica.
- Aumento de la función de la barrera de las mucosas.
- Modulación del hospedero a la respuesta inflamatoria.
- Modulación de la proliferación celular y apoptosis a través de respuesta celular.
- Inhibiendo el crecimiento de patógenos a través de la producción de bacteriocinas o producción de ácidos y peróxido <sup>27</sup>

### ***Efectos en la cavidad oral***

En recientes estudios, el uso de probióticos ha sido mayormente promovidos para contrarrestar infecciones orales como: caries, enfermedades periodontales y halitosis <sup>27</sup>.

Los requisitos indispensables para que un microorganismo pueda ser considerado como probiótico oral no es solo la capacidad de adherirse y colonizar las diferentes superficies de la cavidad bucal, sino también tener la habilidad de no fermentar azúcares para no disminuir el pH de la cavidad bucal pudiendo favorecer la aparición de caries <sup>28, 29</sup>.

- La función de los probióticos en la cavidad bucal sigue en investigación, algunos estudios sugieren que los probióticos pueden actuar de la siguiente manera:

- •Adhiriéndose a diversas estructuras bucales (dientes, biopelícula, tejidos blandos, etc.).
- •Produciendo diversas sustancias antimicrobianas para combatir bacterias patógenas existentes; desencadenando una respuesta inmune en el cuerpo contra la inflamación.
- •Cambiando el pH del medio ambiente de la cavidad bucal para crear un medio más saludable <sup>16, 30</sup>.

Las especies comúnmente usadas en probióticos en la actualidad son: *Streptococcus* sp. *Lactobacillus* sp., y *Bifidobacterium* sp., y los han aplicado en diversos alimentos como la leche, el yogurt, cereales, en goma de mascar o en enjuagues bucales, gotas y recientemente en pastillas masticables <sup>21, 27</sup>

### ***Uso de probióticos en caries dental***

La caries es una enfermedad multifactorial de origen bacteriano que se caracteriza por la desmineralización ácida del esmalte, aparece después de los cambios de homeostasis del ecosistema oral llevado a la proliferación de biopelícula bacteriana, *Streptococcus mutans* mayormente asociada a su desarrollo. Diversos estudios a base del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG, han demostrado su efectividad en niños de 1-6 años con la disminución de *Streptococcus sobrinus* <sup>31</sup> y disminución en niveles de *S. mutans* en niños que consumieron leche con dicho probiótico <sup>32</sup>. En otro estudio *in-vitro* probióticos como: *Lactobacillus rhamnosus* LB21, *Lactobacillus paracasei* F19, *L. reuteri* PTA 5289 y *L. reuteri* ATCC 55730 mostraron inhibición parcial para *Streptococcus* del grupo “mutans” y para *Candida albicans in-vitro* <sup>33</sup>.

## **Tratamiento a base de probióticos de las enfermedades periodontales**

Las enfermedades periodontales son infecciones causadas por microorganismos que colonizan la superficie dental, formando una estructura compleja llamada biopelícula. Esto ha representado un reto en el campo de la periodoncia debido a la gran diversidad de especies bacterianas que forman parte de la microbiota bucal <sup>9, 8</sup>. El tratamiento convencional para la periodontitis va dirigido a la remoción y control mecánico de la biopelícula dentobacteriana y cálculo subgingival, con la finalidad de realizar una remoción mecánica de y evitar la recolonización pronta de patógenos periodontales, no así de especies compatibles con salud periodontal <sup>34</sup>. Por lo que, la terapia periodontal no quirúrgica es considerada el estándar de oro para el manejo de la periodontitis, donde el objetivo es remover las bacterias adheridas de la biopelícula dental, así como los depósitos de cálculo, donde los efectos benéficos de la terapia mecánica se observan en los 3 meses posteriores al raspado y alisado radicular con la reducción del sondeo de la bolsa periodontal y niveles de inserción clínica <sup>35</sup>. La recolonización de la microbiota ocurre en las primeras semanas posteriores al tratamiento y el restablecimiento de la microbiota patógena ocurre en pocas semanas <sup>36, 37</sup>.

Por otro lado, el uso de antisépticos orales y antibióticos para el tratamiento de las enfermedades periodontales es una alternativa que, para países como México, involucra un costo elevado y en el peor de los casos abuso en la automedicación. Por lo mismo, el efecto en la respuesta inflamatoria y recolonización en la microbiota posterior al uso de probióticos orales es indispensable de conocer. En un estudio que evalúa individuos con

gingivitis administrándoles *Lactobacillus casei* subsp. *shirota* se demostró una disminución significativa de la actividad de elastasa y menor producción de metaloproteinasa-3 (involucrados en la respuesta inflamatoria). Demostrando que las enfermedades periodontales pueden verse modificadas por el uso de probióticos a través de la reducción de elementos de la respuesta inflamatoria <sup>38</sup>. En un estudio más reciente con ratones de experimentación con periodontitis inducida, fueron tratados con *Lactobacillus brevis* de uso tópico. Comparando los resultados con los de ratones tratados con placebo (“lyopatch” sin bacteria), mostraron cuentas bacterianas menores de especies como: *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *T. denticola*, redujo la pérdida ósea, la expresión de TNF- $\alpha$  y la inhibición de citocinas inflamatorias atribuida a la producción de óxido nítrico posterior a la administración del probiótico <sup>39</sup>. Otro reporte con pacientes fumadores con enfermedad periodontal demostró que el uso del probiótico *Lactobacillus salivarius* contra el uso de xilitol dónde ambos tratamientos pueden ser de utilidad para reducir las enfermedades periodontales. El grupo que solo recibió xilitol mostró una mejora en el estatus periodontal, sin embargo, los fumadores del grupo que recibieron *L. salivarius*, mostraron una reducción en el índice de placa y bolsas periodontales <sup>40</sup>.

Otro probiótico utilizado en un estudio longitudinal, a base los efectos de *L. reuteri* contenido en goma de mascar, evalúa los niveles del volumen del fluido crevicular, citocinas como Interleucina 1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8), Interleucina 10 (IL-10) y Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) y el sangrado al sondeo. Los resultados de dicho estudio fueron la disminución del volumen del fluido crevicular,

así como la disminución de TNF $\alpha$ , IL-8 y sagrado al sondeo <sup>41</sup>. En 2006, un estudio clínico en pacientes con periodontitis demostró que usando *L. reuteri* Prodentis, se reducía significativamente la acumulación de placa, el sangrado gingival y gingivitis de los sujetos que mascarón goma dental con el probiótico <sup>42</sup>. En 2010, se realizó un estudio aleatorizado, con un grupo control al que se le administró una pastilla con excipiente y un grupo de individuos que consumieron por 2 semanas una pastilla con cepas de *L. reuteri*, los pacientes debían disolver una pastilla por la mañana y otra por la noche después de su cepillado dental. Lo cual demostró reducción del 17% en los niveles de placa dental en un periodo de 14 días y un 42% de reducción en 28 días <sup>43</sup>.

Particularmente los reportes que evalúan efectos clínicos y microbiológicos del probiótico *L. reuteri* Prodentis Biogaia®, como un coadyuvante en la terapia inicial de periodoncia, usándolo por 3 semanas, evalúan si *L. reuteri* puede colonizar las bolsas periodontales en pacientes con periodontitis crónica. Un total de 40 pacientes fueron seleccionados aleatoriamente y divididos en 2 grupos, cada paciente presentó al menos 2 dientes con 1 sitio interproximal de profundidad de bolsa entre 5-7 mm y un índice gingival (con enrojecimiento y sangrado al sondeo)  $\geq$  a 2 sitios en cada cuadrante. El grupo 1 recibió debridación periodontal para remover microorganismos y cálculo subgingival, adicional al consumo de la pastilla que contenía: *L. reuteri* Prodentis  $10^8$  Unidades Formadoras de Colonia (UFC), el grupo 2 recibió debridación periodontal más placebo. Las muestras microbiológicas fueron tomadas en los días 21, 90, 180 y 360 días, las cuales fueron cultivadas y analizadas. El resultado de este estudio demostró que el uso como coadyuvante de *L. reuteri* Prodentis BioGaia® mejoró clínicamente el estado



periodontal de sujetos evaluados comparado con el grupo placebo y redujo la placa dentobacteriana supragingival recuperada, sin embargo, el estudio no especifica qué especies de la placa dentobacteriana se reducían <sup>44</sup>.

### ***Características del probiótico *Lactobacillus reuteri*.***

*L. reuteri* es un microorganismo, residente del tracto gastrointestinal del ser humano y de algunos animales. Es una bacteria Gram positiva y algunas de sus cepas son usadas como probióticos por su la habilidad de producir la proteína reuterina. Es un eficiente colonizador ya que es una especie dominante hetero-fermentativa, única entre los *Lactobacillus* por su capacidad para convertir el glicerol en un potente agente antimicrobiano de amplio espectro. La reuterina es capaz de inhibir el crecimiento y supervivencia de muchas especies o cepas bacterianas Gram negativas y Gram positivas, hongos y protozoarios <sup>45</sup>. Diversas cepas de *L. reuteri* han mostrado gran potencial para el futuro de la salud oral. Biogaia ofrecen un producto específico para uso dental, PerioBalance® de GUM y Probuca-D® de BioGaia, respectivamente.

### **Probuca-D® BIOGAIA**

La presentación es de una pastilla de menta, cada una contiene 200 millones de *L. reuteri* Prodentis (vivos). Se recomienda su uso regular para una buena salud oral o cuando las encías presentan gingivitis. Las indicaciones del uso del probiótico incluyen: dejar que la pastilla se disuelva lentamente en la boca por 10 minutos, preferentemente después del cepillado dental, no debe consumirse ningún agente después de 30 minutos, la dosis diaria es de una pastilla cada 12 horas, la cual no debe de excederse y no es un

sustituto de dieta. Dentro de sus ingredientes se encuentran: relleno (isomalta), *L. reuteri* DSM 17938 y *L. reuteri* ATCC PTA 5289 (*L. reuteri* Prodentis), aceite de palma hidrogenado, sabor menta, sabor mentol, aceite de menta <sup>44</sup>.

A pesar de la efectividad demostrada de los probióticos en diversos aspectos clínicos periodontales, los estudios microbiológicos que demuestran su efectividad no se encuentran bien sustentados, por lo que el objetivo del presente trabajo se basará en el análisis microbiológico molecular y el monitoreo longitudinal clínico periodontal de un paciente.

## PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

El tratamiento periodontal convencional previo a la fase quirúrgica es la fase I que incluye raspado y alisado radicular. La fase I, consiste principalmente en la eliminación mecánica esencial para la remoción de placa dental y cálculo, con la finalidad de obtener la recolonización posterior con un número reducido bacteriano. Sin embargo, en la actualidad no existe un tratamiento enfocado a la eliminación selectiva de especies que componen la placa dentobacteriana con la finalidad de recuperar el equilibrio ecológico microbiano.

Los probióticos, han sido sugeridos como agentes promotores para incrementar el número de bacterias benéficas, retardando la recolonización de patógenos. Su función principal es la de la modulación de parámetros inmunológicos para la prevención y tratamiento de infecciones de carácter endógeno como son las enfermedades periodontales. En la actualidad, existen diferentes probióticos a base de *Lactobacillus* sp.: Perio Balance-GUM<sup>®</sup>, Prodentis de BioGaia, *L. brevis* CD2, etc., que se utilizan como coadyuvantes en el tratamiento de las enfermedades periodontales, los cuales han sido diseñados para promover la salud oral. A pesar de ello, no hay reportes en la literatura que demuestren la efectividad longitudinal en la recolonización bacteriana selectiva de la biopelícula dental. Por lo tanto, con la finalidad de corroborar la eficacia del probiótico *L. reuteri* (Probuca-D<sup>®</sup> BioGaia), se diseñó el presente estudio longitudinal, en el cual se identificará la microbiota subgingival de un individuo con periodontitis generalizada, al cual se le dará tratamiento de un mes con dicho probiótico, con las indicaciones del

fabricante y posteriormente se describirá la microbiota subgingival en los tiempos establecidos.

## **HIPÓTESIS**

Posterior al tratamiento coadyuvante del probiótico *L. reuteri* (Probuca-D® BioGaia), se esperaron encontrar cambios en la recolonización de la microbiota subgingival de 40 especies representativas de los complejos bacterianos de la placa subgingival descrita por Socransky y colaboradores, por medio de la técnica de Checkerboard para hibridaciones DNA-DNA.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Describir la microbiota subgingival de un paciente con periodontitis generalizada y comparar los cambios de esta, a través de un estudio longitudinal para monitorear el tratamiento coadyuvante del probiótico *L. reuteri* (Probuca-D® BioGaia) por medio de la técnica de Checkerboard para hibridaciones DNA-DNA.

### **Particulares.**

- Capturar una historia clínica general y ficha periodontal para estudios de investigación, con la finalidad de determinar los parámetros clínicos periodontales del sujeto de estudio a los 0, 1, 3 y 12 meses del monitoreo del tratamiento coadyuvante, por medio de un clínico calibrado para fines de investigación microbiológica periodontal, para determinar el estado periodontal del sujeto de estudio, para poder clasificarlo con el tipo de periodontitis generalizada, basados en la clasificación de enfermedades periodontales más actual.

- Evaluar la efectividad del probiótico (Probucaal-D® BioGaia), a un mes de tratamiento en un paciente con periodontitis crónica, con evaluación clínica periodontal, particularmente con las medidas de profundidad de bolsa, niveles de inserción, acumulación de placa, sangrado al sondeo y supuración a los 0, 1, 3 y 12 meses de la aplicación del probiótico coadyuvante.
- Evaluación de muestras microbiológicas subgingivales a los 0, 1, 3 y 12 meses del monitoreo del probiótico coadyuvante, por medio de la técnica de checkerboard para evaluar los niveles, prevalencia y proporción individual de 40 especies bacterianas y proporción por complejos bacterianos, y comparación entre los distintos tiempos evaluados de las muestras microbiológicas, por medio de pruebas estadísticas no paramétricas de Kruskal Wallis y U de Mann Whitney, con ajuste de comparaciones múltiples.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó un estudio de tipo longitudinal piloto, en el que se evaluó microbiológicamente a un paciente bajo el tratamiento del probiótico *L. reuteri* (Probuca-D® BioGaia). Se identificaron microbiológicamente muestras de placa subgingival en la visita inicial (0) y a los tiempos: 1, 3 y 12 meses. El sujeto de estudio fue examinado en la primera visita en la que se realizó la evaluación de su estado de salud general y periodontal, se registraron los datos clínicos y se recolectaron las muestras de placa dentobacteriana subgingival, con la cual se determinaron las cuentas (niveles), la prevalencia y la proporción de 40 especies bacterianas por medio de la técnica Checkerboard para hibridaciones DNA-DNA. Se realizó un total de 4 sesiones para realizar el muestreo microbiológico en los tiempos estipulados además de una cita adicional a la semana del muestreo en el tiempo 0 para realizar una profilaxis profesional. A continuación, se describe el procedimiento en cada una de las citas:

Tiempo cero o visita inicial (T0): cita 1, se realizó la evaluación clínica general y periodontal y microbiológica. Cita 2: a la semana se realizó la profilaxis profesional con uso de cavitron. Cita 3: a los 15 días se administró el probiótico de *L. reuteri* (Probuca-D® BioGaia); se proporcionó la indicación de consumir o “disolver” una pastilla cada doce horas por 30 días después de su higiene dental.

Tiempo 1 mes (T1): 1er mes posterior al uso del probiótico, se realizó evaluación clínica periodontal y muestreo microbiológico.

Tiempo 3 (T3): 3er mes posterior al uso del probiótico, se realizó evaluación clínica periodontal y muestreo microbiológico.

Tiempo 12 (T12): 12° mes posterior al uso del probiótico, se realizó evaluación clínica periodontal y muestreo microbiológico.

## **SUJETO DE ESTUDIO**

El sujeto de estudio fue seleccionado de los pacientes de la Facultad de Odontología, de la Universidad Nacional Autónoma de México. El propósito y naturaleza del estudio, incluyendo los procedimientos clínicos y para la recolección de muestras, fueron explicados al sujeto potencial de estudio, el cual recibió copia de la forma de consentimiento informado (**anexo 3**) en la que se delinea explícitamente el protocolo del estudio. Se pidió al paciente que firmará dicha forma, con lo cual estableció su entendimiento sobre el estudio y el deseo voluntario de participar, del cual se le proporcionó una copia.

### **Criterios de selección**

El sujeto incluido en el estudio fue mujer mayor de 30 años, en buen estado de salud general, mexicana por nacimiento, con la misma ascendencia en ambos padres y por lo menos dos abuelos y presentó 23 dientes naturales en boca. No se presentó en gestación o lactancia, no consumió antimicrobianos sistémicos en los tres meses previos a cada muestreo microbiológico, y no fue tratado médicamente ni presentó enfermedades sistémicas tales como diabetes, VIH/SIDA, hemofilia, enfermedades



autoinmunes e hipertensión arterial, entre otras. Los criterios generales de selección se resumen en la **tabla1**.

## **EVALUACIÓN CLÍNICA**

Previo al inicio del estudio, se le realizó una historia clínica general y periodontal y se eliminó el cálculo que pudiera interferir en las mediciones periodontales y toma de muestras microbiológicas, se tomaron las muestras de placa dentobacteriana subgingival considerado como T0, es decir tiempo sin tratamiento con probióticos. Se le dio al sujeto de estudio indicaciones de no cambiar su dieta y seguir su higiene oral cotidiana, así mismo se le proporcionaron las indicaciones para uso del probiótico *L. reuteri* (ProbucaD® BioGaia), las cuáles fueron: uso por 30 días, después del cepillado dental de la mañana y de la noche y; no ingerir alimentos o bebidas después de 30 minutos.

El paciente recibió una evaluación periodontal completa realizada por un clínico calibrado para este propósito, en cada una de las 4 sesiones planificadas los tiempos 0, 1, 3 y 12 meses. Todas las mediciones clínicas se registraron en seis sitios por diente (mesiobucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual y mesiolingual) de todos los dientes en la boca del paciente excluyendo los terceros molares (máximo 168 sitios por sujeto dependiendo del número de dientes faltantes) de acuerdo con procedimientos previamente descritos en la literatura 46.

Se evaluaron y registraron los siguientes parámetros clínicos con medidas dicotómicas de ausencia (0) o presencia (1):

1. Acumulación de placa (AP: 0/1)

2. Enrojecimiento gingival (EG: 0/1)
3. Profundidad de bolsa (PB: mm)
4. Nivel de inserción (NI: mm)
5. Sangrado al sondeo (SS: 0/1)
6. Supuración al sondeo (SUP: 0/1)

La PB y el NI se registraron al mm más cercano utilizando una sonda periodontal “Carolina del Norte” (PCPUNC15) de 15 mm de longitud con marcas en intervalos de 1 mm y marcas distintivas en los intervalos de 5 mm. Estas medidas se registraron dos veces por el mismo clínico y el promedio de las dos mediciones se utilizará para el análisis de datos.

## **EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA**

### **Recolección y procesamiento de muestras**

Las evaluaciones microbiológicas se realizaron en cada una de las 4 sesiones planificadas para el muestreo en los tiempos 0, 1, 3 y 12 meses, mediante la técnica de “Checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA. Este proceso se usa para determinar la abundancia de un organismo en particular en una muestra y así describir estadísticamente los patrones que ocurren en el microorganismo específico con respecto a otro <sup>47</sup>. Se tomaron las muestras de placa dentobacteriana subgingival de los sitios mesiobucales de todos los dientes excluyendo los terceros molares del sujeto de estudio. Después de secar y aislar el área de muestreo con rollos de algodón, la placa

supragingival será eliminada con una cureta Gracey 11/12 (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). Posteriormente, las muestras de placa subgingival se tomaron utilizando el mismo tipo de curetas estériles y se colocaron en tubos para micro centrifugación de 1.5 ml que contenían 150 µl de buffer TE pH 7.6 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA. Sigma-Aldrich Química, Toluca, Estado de México). Se agregaron 100µl de NaOH (0.5M. Sigma-Aldrich) a cada tubo y las muestras se dispersaron. Los tubos se hierven durante 10 min y el pH neutralizado con 800 µl de acetato de amonio (0.5M. Sigma-Aldrich). El DNA de cada muestra se colocó en uno de los canales abierto de un Minislot-30 (Immunitics Inc., Boston, MA, USA), concentrado en una membrana de nylon de carga positiva de 15 x 15 cm (Roche Diagnostics, Basel, Suiza) y fijado a la membrana mediante entrecruzamiento con luz ultravioleta seguido por incubación a 120°C durante 20 min. Dos canales de estándares microbiológicos se colocaron en cada membrana. Dichos estándares consistieron en mezclas ajustadas a 10<sup>5</sup> y 10<sup>6</sup> células de cultivos puros de las 40 cepas bacterianas que serán analizadas para dar un total de hasta 1120 identificaciones (**figura 4**).

### **Especies bacterianas y condiciones de cultivo para “Checkerboard”**

La lista de las 40 cepas bacterianas de referencia, utilizadas en el presente estudio para la preparación de sondas de DNA se encuentra en la **tabla 2**. Todas las cepas fueron adquiridas como cultivos liofilizados del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Las cepas liofilizadas fueron rehidratadas en caldo para Mycoplasma (Becton Dickinson, Microbiology Systems, BBL™, Sparks, MD, USA) y cultivadas en medio enriquecido que contenía agar base para Mycoplasma (Becton Dickinson), 5 µl/ ml

hemina (Sigma-Aldrich), 0.3 µg/ml menadione (Sigma-Aldrich) y 5% sangre de carnero defibrinada (Laboratorios Microlab, México, D.F.) a 35°C de 3 a 7 días. Únicamente *Neisseria mucosa* se cultivó bajo condiciones aeróbicas, el resto de las especies bacterianas se cultivaron dentro de una cámara de anaerobiosis con ambiente de 80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y 10% H<sub>2</sub>. Las especies que se mencionan a continuación se sembraron en otros medios suplementados: *Campylobacter* sp.: en medio enriquecido suplementado en la superficie con 0.2 ml de formato/ácido fumárico (60 % cada uno pH 7.0. Sigma-Aldrich); *T. denticola*: en caldo para Mycoplasma (Becton Dickinson) suplementado con ácido thioglicólico (0.05 mg/ ml. Sigma-Aldrich), L-cisteína-HCl (1 mg/ ml. Sigma-Aldrich), L-asparagina (0.026 mg/ ml. Sigma-Aldrich), glucosa (2.1 mg/ ml. Sigma-Aldrich), solución de pirofosfato de tiamina al 0.3% (cocarboxilasa 2 mg/ ml. Sigma-Aldrich), solución VFA al 0.2 % (ácido isobutírico, ácido metilbutírico, ácido isovalérico y ácido valérico cada uno al 0.5 % en NaOH 0.1 M. Sigma-Aldrich) y suero de conejo (2 %. Gibco™, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA); *T. forsythia*: en medio enriquecido suplementado con ácido n-acetilmurámico (10 µg/ml. Sigma-Aldrich).

### **Purificación de DNA y preparación de sondas**

El crecimiento después de tres a siete días de cultivo fue recolectado y colocado en tubos para micro centrifugación de 1.5 ml con 1 ml de amortiguador TE pH 7.6. Las células se lavaron dos veces mediante centrifugación en el mismo amortiguador a 3,500 rpm durante 10 min. Posteriormente, fueron resuspendidas mediante sonicación durante 15 seg. y lisadas a 37°C durante 1 h ya sea con 10% SDS (Sigma-Aldrich) y proteinasa K (20 mg/ ml, Sigma-Aldrich) para las especies Gram negativas, o con una

mezcla enzimática de 15 mg/ ml de lisozima (Sigma-Aldrich) y 5 mg/ ml de Achromopeptidasa (Sigma-Aldrich) en amortiguador TE (pH 8.0) para las especies Gram positivas. El DNA fue aislado y purificado utilizando una técnica de purificación por medio de la metodología extracción de DNA modificada del Instituto Forsyth Cambridge, MA, con el kit MasterPure™ (Epicentre®). La concentración de DNA se determinó mediante mediciones espectrofotométricas de la absorbancia a 260 nm. La pureza de las preparaciones fue valorada mediante el cálculo de la relación entre las mediciones de las absorbancias a 260 nm y 280 nm. Las sondas de DNA genómico fueron preparadas para las 40 especies bacterianas mediante el marcaje con digoxigenina (Roche) de 1 µg de DNA purificado utilizando la técnica de primers aleatorios (random primer technique) previamente descrita <sup>48</sup>.

### **Hibridaciones DNA-DNA.**

Las membranas fueron prehibridizadas a 42°C durante una hora en solución de prehibridación con 50% de formamida (Sigma-Aldrich), 5x citrato salino estándar (SSC) (1x SSC: 150 mM NaCl, 15 mM citrato de sodio, pH 7.0. Sigma-Aldrich), 1% de caseína (Sigma-Aldrich), 5x solución Denhardt, 25 mM fosfato de sodio (pH 6.5. Sigma-Aldrich) y 0.5 mg/ ml de RNA de levadura (Roche). La membrana con DNA fijado de las muestras se colocó en un miniblottter-<sup>45</sup> (Immunetics) con los canales de las muestras rotados 90° en relación con los canales de hibridación. Las sondas de DNA se diluyeron a una concentración de aproximadamente 20 ng/ ml en solución de hibridación (45% formamida, 5x SSC, 1x solución Denhardt, 20mM fosfato de sodio (pH 6.5), 0.2mg/ml de RNA de levadura, 1% caseína y 10% sulfato de dextrano, Sigma-Aldrich), colocadas en

canales de hibridación individuales del Miniblotter-45 e hibridizadas durante 16 horas a 42°C con el aparato sellado dentro de una bolsa de plástico para evitar evaporación de las sondas de DNA. La concentración de cada sonda se ajustó mediante pruebas preliminares de ensayo y error para que todas las sondas detecten un rango de células entre  $10^4$  y  $10^7$ . Las membranas fueron lavadas dos veces a alta astringencia durante 20 minutos cada vez a 68°C en buffer de fosfato (0.1x SSC y 0.1 % SDS) utilizando un baño con circulación.

### **Detección y cuantificación de microorganismo**

Las membranas se bloquearon mediante su incubación durante una hora en amortiguador bloqueador de 1% de caseína en amortiguador de maleato (100 mM ácido maleico, 150 mM NaCl, pH 7.5. Sigma-Aldrich). Los híbridos se detectaron mediante la incubando las membranas en una dilución de 1:50,000 de anticuerpo contra digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (Roche) utilizando la modificación previamente descrita <sup>49</sup>. Después de ser lavadas, las membranas se incubaron en un agente quimioluminiscente de detección (CDP-Star, Roche) a 37°C durante una hora y las señales se detectaron mediante la exposición de las membranas a películas autoradiográficas dentro de cassettes, a temperatura ambiente durante 35 minutos. Las películas fueron reveladas siguiendo procedimientos estándar y posteriormente se fotografiaron con cámara Digital (Kodak™ Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) en un sistema digital de foto documentación (DigiDoc™. BioRad). Las señales se analizaron mediante la utilización de un software especializado (Quantity One™. BioRad) para

determinar las cuentas bacterianas absolutas de cada especie en cada muestra, con base a los estándares a  $10^5$  y  $10^6$  células (**figura 4**).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS**

Los datos generados en el presente estudio, fue sometido a análisis estadísticos descriptivo de los parámetros clínicos evaluados tales como género, edad, toma de antibióticos en los últimos 3 meses, fumador actual, número de dientes presentes, el tiempo en consumo del probiótico y tratamiento periodontal previo (**tabla 3**). Asimismo, se describieron los parámetros clínicos periodontales por grupos de estudio en tiempos (0, 1, 3 y 12) de PB, NI, números de sitios con  $NI \geq 5$ , AP, EG, SS y SUP, los cuales se expresan con media  $\pm$  error estándar de la media y rango. Los datos clínicos periodontales fueron comparados entre grupos de distintos tiempos posteriores al uso del probiótico (1, 3 y 12 meses) contra el T0, utilizando pruebas no-paramétricas Kruskal Wallis y U de Mann-Whitney, con corrección para comparaciones múltiples (**tablas 4a y 4b**), como reporta la literatura <sup>50</sup>.

Se determinó la composición de la placa dentobacteriana subgingival del sujeto de estudio, calculando las cuentas absolutas de cada una de las 40 especies bacterianas evaluadas en cada muestra de manera individual. Los análisis compararon la composición microbiológica entre las muestras del sujeto de estudio, tomadas en los cuatro distintos tiempos (0, 1, 3 y 12 meses). Los datos microbiológicos se expresaron como la media  $\pm$  error estándar de la media de los niveles (cuentas bacterianas  $\times 10^5$ ), proporción (porcentaje del total de las cuentas de las sondas DNA) y prevalencia

(porcentaje de sitios colonizados), cada uno calculado para cada especie bacteriana en cada muestra, promediado en el sujeto de estudio. Los datos clínicos periodontales fueron comparados entre grupos de distintos tiempos posteriores al uso del probiótico (1, 3 y 12 meses) contra el T0, utilizando pruebas no-paramétricas Kruskal Wallis y U de Mann-Whitney, con corrección para comparaciones múltiples, como reporta la literatura<sup>50</sup>.



## RESULTADOS

### EVALUACIÓN CLÍNICA

#### Características del sujeto de estudio

Los parámetros clínicos evaluados tales como género, edad, toma de antibióticos en los últimos 3 meses, fumador actual, número de dientes presentes, el tiempo en consumo del probiótico y tratamiento periodontal previo, se describen en la tabla 3. Como sujeto de estudio, se evaluó a una mujer mexicana de 35 años, sin enfermedades sistémicas, no fumadora, que no consumió antibióticos por tres meses previos a la visita y con presencia de 23 dientes durante el periodo que duró el estudio. Todos los criterios de inclusión fueron acordes con los establecidos en la metodología del presente estudio. La paciente presentó periodontitis generalizada y del expediente clínico periodontal y radiográfico, se pudo determinar que presentaba periodontitis generalizada estadio IV, grado B.

Con la finalidad de mostrar las características clínicas, se documentaron fotografías orales del sujeto de estudio en el tiempo 0 (inicial) y en el T1 (consumo del probiótico). Se observó que la paciente es portadora de prótesis removible mal ajustada en la zona de dientes anteriores superiores, con presencia de manchas melánicas en la encía y con presencia de absceso en el diente 46 (**figura 5**). Concordante con los resultados clínicos periodontales (**tabla 4a**), el enrojecimiento gingival disminuyó notablemente durante el consumo de probiótico, cambio reflejado en las fotografías clínicas y posteriormente

corroborado con la disminución del enrojecimiento gingival clínico en el T3 (**tabla 4a**) y la desaparición de la fistula en la zona del diente 46.

Adicionalmente, la paciente refirió que, a pesar de haber suspendido el consumo del probiótico, después del primer mes, la halitosis disminuyó y el sabor de boca cambió, posterior al tratamiento se remite a la paciente para ajuste de prótesis, tratamiento periodontal, tratamiento de conductos del diente 36 y retratamiento de endodoncia en diente 46.

### **Características periodontales**

Los parámetros clínicos periodontales, evaluados en los distintos tiempos de estudio (0, 1, 3 y 12), PB, NI, números de sitios con NI $\geq$ 5, AP, EG, SS y SUP, se expresaron con media  $\pm$  error estándar de la media y rango en la **tabla 4a**. Las diferencias con la prueba estadística Kruskal Wallis mostró significancias únicamente en ENR, particularmente con la prueba U de Mann-Whitney, las significancias de ENR fueron en T0 vs T3, T1 vs T3 y T3 vs T12 **tabla 4b**.

El tiempo 1, al ser el tiempo del consumo del probiótico, fue el de principal interés, sin embargo, no presentó diferencias significativas mayores. Los parámetros clínicos periodontales que disminuyeron fueron: PB (T0: 4.09 vs T1: 3.57), NI (T0: 2.13 vs T1: 1.63), número de sitios con NI $\geq$ 5mm (T0: 13.04 vs T1: 4.35) y ENR (T0: 60.87 vs T1: 56.52).

Las diferencias mayormente encontradas en los parámetros clínicos periodontales fueron en el T3 comprado contra el T0, dónde se observaron aumentos sustanciales de

PLA (T0: 21.74 vs T3: 69.57)  $p < 0.01$ , ENR (T0: 60.87 vs T3: 100)  $p < 0.001$  y SS (T0: 13.04 vs T3: 52.57)  $p < 0.01$ .

Los parámetros que disminuyeron, aunque sin diferencias significativas fueron: PB (T0: 4.09 vs T1: 3.85), NI (T0: 2.13 vs T1: 2.20), número de sitios con NI  $\geq 5$  mm (T0: 13.04 vs T1: 8.70) y SUP (T0: 4.35 vs T3: 0).

Los parámetros que variaron en el T12 comparado con el T0 fueron: PB (T0: 4.09 vs T12: 3.28), NI (T0: 2.13 vs T12: 1.52), número de sitios con NI  $\geq 5$  mm (T0: 13.04 vs T12: 4.35) y EG (T0: 60.87 vs T12: 34.78) con disminución. Los parámetros clínicos que aumentaron fueron: PLA (T0: 21.74 vs T12: 39.13), SS (T0: 13.04 vs T12: 17.39) y SUP (T0: 4.35 vs T12: 13.04) sin diferencias significativas.

## EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA

La evaluación microbiológica de la paciente fue separada en los distintos tiempos de estudio (0, 1, 3 y 12), donde se describen las cuentas totales promedio, cuentas, prevalencia y proporción promedio (**fig 6**) de las 40 especies evaluadas individualmente y promediadas entre las muestras de los distintos tiempos. Todos los datos fueron expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM).

### Niveles promedio

En la **figura 6** se observan las cuentas totales  $\times 10^5$  células del promedio de las muestras totales por tiempos evaluados. Las cuentas en cada uno de los tiempos fueron T0: 115.12, T1: 138.48, T3: 204.87 y T12: 182.42, donde T0 y T1 presentaron menor

número de cuentas. Las comparaciones entre grupos con la prueba de Kruskal- Wallis y U de Mann-Whitney no mostraron diferencias significativas.

En el T3 se presentaron mayores cuentas totales que en el T0 (dos meses posteriores al consumo del probiótico).

En la tabla 5a y **figura 7a** se observan los niveles promedio (cuentas bacterianas x  $10^5 \pm$  EEM) de las 40 especies bacterianas individuales evaluadas en los distintos tiempos y ordenadas por complejos bacterianos, en orden alfabético. Las diferencias significativas se describen en la tabla 5b. En las comparaciones del T1 contra el T0, 16 de las 40 especies evaluadas disminuyeron en sus cuentas bacterianas para el T1, en la cual únicamente *P. micra* (T0: 8.47 vs T1: 4.52) presentó  $p < 0.05$ . La especie que presentó aumentos fue: *P. loescheii* (T0: 0.71 vs T1: 4.28)  $p < 0.01$ . A pesar de que 24 de las 40 especies evaluadas en T1, no disminuyeron con el tratamiento de probióticos, ninguna tuvo diferencias significativas (**tabla 5b figura 7a**).

Al comparar el T3 contra el T0, 5 especies tuvieron cuentas significativamente mayores que en el T0: *T. denticola* (T0:2.91 vs T3: 10.44), *C. showae* (T0: 0.83 vs T3: 4.48), *C. sputigena* (T0:0.75 vs T3:4.97)  $p < 0.05$ ; *A. odontolyticus* (T0: 1.56 vs T3: 5.89)  $p < 0.01$  y; *F. periodonticum* (T0: 1.55 vs T3: 9.29)  $p < 0.001$  (figura 7a). En las comparaciones del T12 contra el T0, las especies con cuentas mayores que en T0 fueron: *E. nodatum* (T0: 0.91 vs T12:2.83) y *P. nigrescens* (T0:4.67 vs T12: 13.06)  $p < 0.05$ ; *T. denticola* (T0: 2.91 vs T12: 9.72), *P. gingivalis* (T0:2.79 vs T12:11.95)  $p < 0.01$  y; *S. sanguinis* (T0: 1.95 vs T12:5.61), A.

*odontolyticus* (T0: 1.56vs T12:7.87), *F. periodonticum* (T0:1.55 vs T12:5.19), *C. showae* (T0:0.83 vs T12: 5.23), *P. loescheii* (T0:0.71 vs T12: 5.71)  $p<0.001$ .

La especie con diferencias significativamente mayores fue: *F. periodonticum* (T0: 1.55 vs T12: 5.19)  $p<0.001$ . Las diferencias entre cuentas bacterianas con aumentos significativos fueron menores entre T1 vs T12 para *E. nodatum* (T1:0.87 vs T12: 2.83) y T3 vs T12 con disminuciones significativas para *V. parvula* (T3:11.36 vs T12: 2.59), *Gemella morbillorum* (T3:2.85 vs T12: 0.63) y *C. sputigena* (T3:4.97 vs T12: 1.04) (**tabla 5b, figura 7a**).

### **Prevalencia promedio**

En la **tabla 6a y figura 8a** se describe la prevalencia promedio de las especies evaluadas individualmente, en los distintos tiempos. Se observó que 10 de las 40 especies bacterianas en T1 comparado con el T0 presentaron menor prevalencia, únicamente *G. morbillorum* (T0: 34.8 vs T1: 82.6)  $p<0.05$ , aumentó con diferencias significativas en el T1.

De las 10 especies que disminuyeron aunque no fueron significativas están: *S. gordonii* (T0: 78.3 vs T1:65.2), *E. corrodens* (T0: 56.5 vs T1: 47.8), *C. gracilis* (T0: 69.6 vs T1:60.9), *P. micra* (T0: 100 vs T1:91.3), *T. forsythia* (T0: 91.3 vs T1:69.6), *S. noxia* (T0: 82.6 vs T1:60.9), *C. matruchotii* (T0: 82.6 vsT1:73.9), *E. saburreum* (T0: 95.7 vs T1: 69.6), *F. alocis* (T0: 65.2 vs T1: 60.9) y *P. acnes* (T0: 82.6 vs T1: 65.2).

Las comparaciones en la prevalencia de las especies entre T0 y T3 no presentaron diferencias significativas: *A. naeslundii* (T0:69.6 vs T3: 47.8), *A. viscosus* (T0:69.6 vs T3:

65.2), *C. gracilis* (T0:69.6 vs T3:34.8), *F. nucleatum* (T0:69.6 vs T3:65.2), *P. micra* (T0: 100 vs T3: 65.2), *S. constellatus* (T0: 43.5 vs T3: 39.1), *T. forsythia* (T0: 91.3 vs T3: 87.0), *C. matruchotii* (T0: 82.6 vs T3:73.9), *E. saburreum*(T0:95.7 vs T3:60.9) y *P. acnes* (T0: 82.6 vs T3: 65.2).

Fue hasta el T12 dónde 6 de las 40 especies mostraron menores diferencias significativas: *V. parvula* (T0: 82.6 vs T12: 69.6), *E. corrodens* (T0: 56.5 vs T12: 47.8), *C. gracilis* (T0: 69.6 vs T12:65.2), *P. micra* (T0: 100 vs T12: 87), *S. noxia* (T0:82.6 vs T12:47.8), *G. morbillorum* (T0:34.8 vs T12: 30.4) y *P.acnes* (T0: 82.6 vs T12:65.2) prevalencia entre T0 vs T12, manteniéndose similares las comparaciones entre T1 vs T12. En las comparaciones entre T3 vs T12 que tuvieron diferencias fueron únicamente en 2 especies: *S. sanguinis* (T3: 39.1 vs T12:100)  $p<0.05$  y *A. georgiae* (T3:52.2 vs T12:100)  $p<0.01$  las cuales aumentaron significativamente su prevalencia (**tabla 6b**).

### **Proporción promedio**

Las proporciones promedio de especies individuales, evaluadas en los distintos tiempos del estudio, son mostradas en la **tabla 7a** y **figura 9b**, las diferencias significativas se describen en la **tabla 7b**. De las comparaciones entre el T1 vs el T0, 18 especies individuales presentaron menores proporciones promedio, dónde únicamente *P. micra* (T0:9.52 vs T1: 4.06)  $p<0.01$  y *S. gordonii* (T0:4.75 vs T1:1.09)  $p<0.05$  disminuyó con diferencias significativas, y las especies que presentaron proporciones significativamente mayores fueron: *P. loeschii* (T0:0.23: vs T1:2.60), *F. periodonticum* (T0:

0.84 vs T1: 2.85)  $p < 0.01$  y *G. morbillorum* (T0: 0.35 vs T1: 1.60)  $p < 0.05$ . El resto de las especies no presentó diferencias significativas (**tabla 7b**).

En las comparaciones del T3 (dos meses posteriores al tratamiento) 20 de las 40 especies disminuyeron con proporciones significativamente menores para:

*E. saburreum* (T0: 5.42 vs T3:1.87)  $p < 0.001$ , *F. periodonticum* (T0: 0.84 vs T3:5.23)  $p < 0.001$  y *P. acnes* (T0:2.10 vs T3:0.48)  $p < 0.01$  y las especies con mayor proporción fueron: *T. denticola* (T0:2.21 vs T3:5.16)  $p < 0.05$  y *C. showae* (T0:0.41 vs T3:1.59)  $p < 0.01$ , comparado con el T0 (**tabla 7b**).

En las comparaciones del T12 contra el T0, 21 de las 40 especies disminuyeron con proporciones significativas menores para: *E. saburreum* (T0: 5.42 vs T12: 2.62)  $p < 0.01$ , *P. acnes* (T0:2.10 vs T12:0.52)  $p < 0.01$ , *P. micra* (T0:9.52 vs T12:3.32)  $p < 0.001$ , *F. periodonticum* (T0:0.84 vs T12:3.17)  $p < 0.001$  y *S. noxia* (T0:3.32 vs T12:0.51)  $p < 0.05$  y con proporciones significativamente mayores para: *S. sanguinis* (T0: 1.14 vs T12:2.68)  $p < 0.05$ , *A. actinomycetemcomitans* (T0:0.26 vs T12:1.37)  $p < 0.05$ , *T. denticola* (T0:2.21 vs T12:5.49)  $p < 0.01$ , *E. nodatum* (T0:0.37 vs T12:1.31)  $p < 0.01$ , *P. loescheii* (T0:0.23 vs T12: 2.49)  $p < 0.001$ , *A. odontolyticus* (T0:0.76 vs T12: 3.79)  $p < 0.001$  y *C. showae* (T0:0.041 vs T12:2.59)  $p < 0.001$ . En las comparaciones entre el T1 y tiempo 12 aumentó el número de especies con diferencias significativas menores fueron: *V. parvula* (T1:5.37 vs T12: 1.31) y *G. morbillorum* (T1: 1.60 vs T12: 0.19)  $p < 0.01$  y *C. sputigena* (T1: 1.66 vs T12: 0.31)  $p < 0.05$  y las que tuvieron un mayor aumento fueron: *S. sanguinis* (T1: 0.90 vs T12: 2.86), *T. denticola* (T1: 2.13 vs T12: 5.49), *E. nodatum* (T1:0.30 vs T12: 1.31)  $p < 0.001$ , *A.*

*odontolyticus* (T1: 1.55 vs T12:3.79, *C. showae* (T1:1.07 vs T12:2.59), *S. gordonii* (T1: 1.09 vs T12:3.05)  $p<0.01$  (**tabla 7b**).

Las proporciones por complejos bacterianos son mostradas en la **tabla 8a** y figura 10. Al comparar T1 contra T0 no se observaron diferencias estadísticamente significativas, aunque los complejos “*Actinomyces*” (T0:11.33 vs T1: 16.02), complejo “morado” (T0:4.80 vs T1: 6.92), “verde” (T0: 3.54 vs T1:5.54) y “otros” (T0:22.03 vs T1:23.64) presentaron mayores proporciones, mientras que el complejo “amarillo” disminuyó (T0: 14.46 vs T1:7.99). Los complejos relacionados con enfermedad periodontal “naranja” (T0: 29.04 vs T1:28.01) y “rojo” (T0: 11.21 vs T1: 8.59) así como las bacterias “no agrupadas” (T0: 3.58 vs T1: 3.29) disminuyeron sus proporciones en T1 contra el T0. El “complejo morado” (T0: 4.80 vs T3:11.08) en T3 presentó aumentos significativos comparados con T0  $p<0.01$ . Los complejos que disminuyeron, aunque sin diferencias significativas, después del consumo del probiótico fueron “*Actinomyces sp.*” (T0: 11.33 vs T3: 3.64), “no agrupados” (T0: 3.58 vs T3: 3.24) y “otros” (T0: 22.03 vs T3: 18.98) y las especies “no agrupadas” en T12 (T0: 3.58 vs T12: 1.87) presentaron menores proporciones  $p<0.05$  en comparación contra el T0, 3 complejos disminuyeron sus proporciones sin diferencias significativas en este mismo tiempo: “morado” (T0: 4.80 vs T12: 5.10), “verde” (T0: 3.54 vs T12: 2.82) y “otros” (T0: 22.03 vs T12:18.58) **tabla 8b** **figura 10**.



## Evaluación microbiológica del diente 46

En la **figura 11** se observan las cuentas totales x  $10^5$  células de las 40 especies bacterianas promediadas de la muestra del diente 46, por tiempos evaluados. Las cuentas totales en cada uno de los tiempos fueron T0: 55.03, T1: 66.68, T3: 63.34 y T12: 20.12, dónde en el T12 se presentó menor número de cuentas, mientras que en T1 y T12 comparado con el T0 se mantiene muy similar.

Las proporciones promedio de las 40 especies individuales, en la muestra de placa dentobacteriana subgingival del diente 46, evaluadas en los distintos tiempos, se muestran en la gráfica de la **figura 11**. Pudimos observar que comparando los distintos tiempos contra el tiempo inicial, disminuyeron por más del 50% las especies no patogénicas periodontales: *A. georgiae* (T0: 11.53 vs T3: 0), *A. viscosus* (T0: 15.8 vs T1: 12.49), *S. intermedius* (T0: 3.65 vs T3 y T3: 0), *S. oralis* (T0: 3.14 vs T1 y T3: 0), *S. sanguinis* (T0: 3.33 vs T1: 2.56 y T3: 0), *A. odontolyticus* (T0: 19.46 vs T1: 2.62 y T3: 2.43), *V. parvula* (T0: 19.46 vs T3: 0), *C. gingivalis* (T0: 3.33 vs T1, 3 y 12: 0), y las especies patógenas periodontales: *T. denticola* (T0: 1.28 vs T1, 3 y 12: 0), *A. actinomycetemcomitans* stp. b (T0: 12.86 vs T1 y 12: 0, T3: 0.97) y los complejos bacterianos correspondientes a las especies mencionadas.

## DISCUSIÓN

El propósito del presente estudio longitudinal, fue el de evaluar las características microbiológicas subgingivales previas (T0) y posteriores de la administración del probiótico *L. reuteri* (diaria dos veces al día), durante un mes (T1) y en meses posteriores al tratamiento coadyuvante (T3 y T12), en una mujer de 35 años de edad, con periodontitis generalizada, de acuerdo con la clasificación más actual de las enfermedades y condiciones periodontales <sup>1</sup> considerando distribución, extensión, severidad IV y grado B.

Actualmente, el uso de probióticos para la salud oral es controversial debido a la poca evidencia sobre su efecto en la biopelícula dental. En el presente estudio, seleccionamos el probiótico *L. reuteri*, ya que dicha especie se encuentra normalmente en cavidad bucal, y por su habilidad para interferir en el crecimiento de patógenos orales por sus propiedades antibacterianas gracias a su proteína reuterina <sup>45</sup>. La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha, han buscado que el probiótico *L. reuteri*, permanezca en saliva después de determinado tiempo de su administración, esto en: pacientes con bolsas periodontales  $\geq 6$  mm, dónde aseguran que la cantidad bacterias posterior al uso del probiótico, reduce notablemente <sup>51</sup>.

En la evaluación realizada sobre las características clínicas periodontales, el sujeto del presente estudio no presentó diferencias significativas en los parámetros que indican pérdida de tejidos de soporte dental (PB y NI) <sup>43, 52</sup> del T1 al T12, mientras que los parámetros clínicos de ENR y SS disminuyeron únicamente mientras se administró el

probiótico (T1) y se mantuvieron con aumentos, posterior al uso del probiótico (T3 y T12). Dicho resultado puede indicar, que la inflamación gingival del paciente disminuyó notablemente, y la periodontitis se mantuvo durante el año de seguimiento, a pesar de no haberse realizado un tratamiento adicional al de su limpieza dental y uso del probiótico (*L. reuteri*) en el T1. Por otro lado, en cuanto a los modificadores ambientales de riesgo para acumulación de placa dental <sup>53</sup>, el sujeto de estudio portó prótesis removible. Respecto a esto, mientras que la literatura reporta el impacto de la acumulación de placa dental con el desarrollo de la biopelícula en dientes naturales <sup>36</sup>, ya que las superficies rugosas de una prótesis removible pueden alterar la composición de la biopelícula dental, el factor de riesgo ambiental del sujeto del presente estudio se mantuvo presente hasta el final de la evaluación microbiológica. Lo anterior se decidió con la finalidad de no obtener falsos positivos en cuanto a la reducción de placa dental por cambios en las variables presentes desde el T0. En la clasificación periodontal más actual de las condiciones y enfermedades periodontales <sup>1</sup>, se menciona que tanto la gingivitis como la periodontitis inducida por placa dental, se pueden relacionar con el uso de aditamentos protésicos <sup>54</sup>, por lo mismo, se le recomienda a la paciente que, al finalizar el uso del probiótico, acuda no sólo a la atención periodontal, sino protésica para poder eliminar el factor causal primario de acumulación de placa.

La literatura reporta una estrecha relación entre las lesiones periodontales y endodóncicas, en dónde la microbiota subgingival puede relacionarse en las lesiones endo-periodontales <sup>1, 55</sup>. En el sujeto de estudio evaluado, la zona con la presencia de fístula del diente 46, la paciente presentaba un tratamiento de conductos con lesión

persistente, al tiempo inicial de la evaluación. Mientras que durante el periodo de uso de probiótico no se observó una disminución en las cuentas totales bacterianas evaluadas en los T1, T3, en el T12 refiere la paciente una disminución bacteriana notable, con disminución en la proporción de especies periodontopatógenas como: *A. actinomycetemcomitans* sp. b y *T. denticola* posterior al uso del probiótico y de especies no patogénicas de *Actinomyces* y *Streptococcus* y *C. gingivalis*, no así para especies patógenas putativas. A pesar de que la lesión endodóncica mostró mejoría durante el estudio, no podemos inferir que sea por la administración del probiótico, ya que, durante la administración de este, ya que no se observaron las menores cuentas bacterianas promedio en el T1. La lesión endoperiodontal es una comunicación patológica entre los tejidos pulpar y periodontal en un diente dado que puede presentarse en forma aguda o crónica. Los signos principales asociados con esta lesión son bolsas periodontales profundas, se extienden hasta el ápice de la raíz y/o respuesta negativa o alterada a las pruebas de vitalidad pulpar. Otros signos o síntomas pueden incluir evidencia radiográfica de pérdida ósea en la región apical o de furcación, dolor espontáneo o dolor a la palpación y percusión, exudado o supuración purulenta, movilidad dental, fístula o tracto sinusal y alteraciones de la corona y el color gingival. Los signos observados en las lesiones endo-periodontales asociadas con factores traumáticos y/o iatrogénicos pueden incluir perforación de la raíz, fractura, agrietamiento o resorción externa de la raíz<sup>1,55</sup>. Estas condiciones perjudican drásticamente el pronóstico del diente involucrado como sucedió en la paciente evaluada.

Actualmente, la literatura reporta diversos estudios en los que evalúan el efecto del probiótico a partir de *Lactobacillus* sp., ver **tabla 10**. En un estudio dónde se evalúa el efecto de *L. salivarius* BW21 <sup>56</sup>, se menciona la disminución de cuentas bacterianas totales de *T. forsythia* a las 4 y 8 semanas de uso (por un mes) del probiótico. Por otro lado, otros reportes aseguran que los efectos antimicrobianos de *L. salivarius* interfieren en el crecimiento de bacterias patógenas orales, porque interfieren en la microbiota periodontal al actuar como remplazos bacterianos <sup>57</sup>, sugiriendo que el uso de probióticos puede ser aplicado como tratamiento preventivo de la enfermedad periodontal, al interferir con el desarrollo de patógenos periodontales. Concordante con el presente estudio, se observó la disminución de cuentas, prevalencia y proporción de *T. forsythia* <sup>56</sup>, aunque esta no presentó diferencias significativas en ninguno de los tiempos posteriores a la administración del probiótico *L. reuteri*. Por otro lado, las especies: *T. denticola* y *P. gingivalis* patógenas del complejo “rojo” aumentaron en los distintos tiempos del presente estudio, con diferencias significativas para *P. gingivalis*, únicamente en T12 contra el T0, resultado similar a dos estudios previos, dónde se observó un aumento de especies bacterianas tanto benéficas como periodontopatógenas de placa subgingival. Lo que mencionan en dichos artículos, es que pudiera ser un efecto enmascarado del probiótico sobre el aumento de especies “benéficas” simultáneo al aumento de algunas especies patógenas, pero no de todas las especies que pudieran jugar un papel patogénico en la placa subgingival <sup>51, 56</sup>. Dicha aseveración se observa muy clara en los complejos bacterianos de T1 contra T0 dónde los complejos compatibles con salud (*Actinomyces* sp., morado y verde) aumentaron,

mientras que los complejos de las especies patógenas reconocidas y putativas (rojo, naranja y no agrupadas) disminuyeron, resultado no reproducible mientras el sujeto de estudio dejó de consumir el probiótico (T3 y T12). A diferencia de tres estudios previos realizados <sup>43, 58, 59</sup> en los cuales obtuvieron disminución de *P. gingivalis* con el uso del probiótico *L. reuteri* en conjunto con terapia periodontal. Corroborando nuevamente los resultados del presente estudio, en que algunas de las especies relacionadas con periodontitis disminuyeron durante la administración del probiótico, las especies *P. micra* y *F. periodonticum* disminuyeron en cuentas y/o proporciones individuales del T1 contra el T0, considerando que son especies patógenas putativas del complejo naranja, relacionada con patogenicidad, y que es bien conocido que la predisposición de periodonto patógenos putativos se correlaciona con una falta de mejoría clínica e incrementa el riesgo de reincidencia de las enfermedades periodontales <sup>47, 60</sup>. En cuanto a la disminución de *F. periodonticum* durante el uso de probióticos, la literatura reporta que desencadena la producción de metaloproteinasas de la matriz por parte del huésped, contribuyendo inicialmente a la inflamación gingival y posteriormente a periodontitis <sup>61</sup>, por lo que hay que considerar la reducción de dichas especies en el tratamiento periodontal.

Poniendo atención sobre las especies de *Prevotella*, es claro que el probiótico no presenta un efecto sobre dicho género, mientras se consumió el probiótico. En el presente estudio, observamos un aumento en cuentas, prevalencia y proporción de *P. loeschii*, clasificada en el complejo de “otros” actualmente se encuentra relacionada con las enfermedades periodontales. La literatura reporta que las bolsas con periodontitis

progresiva que no ha sido tratada, se encuentran con alta prevalencia de *Prevotella* sp.<sup>62</sup>, esto podría sugerirnos que con un tratamiento tradicional de fase 1 y el uso de probiótico podríamos tener disminución de dichas especies.

En cuanto a alta prevalencia y proporción que se encontró para la especie *G. morbillorum* durante del consumo del probiótico (T1), nos resulta de interés, ya que es una especie a la cual se ha asociado recientemente con alteraciones metabólicas en diabetes tipo 2<sup>63</sup>. Sin embargo, no podemos hacer injerencia sobre la microbiota y el estado hiperglucémico o metabólico del sujeto del presente estudio, únicamente contamos con los datos de su historia clínica de no presentar ninguna enfermedad sistémica.

Los métodos utilizados para la evaluación de la microbiota subgingival, han sido en su mayoría por técnicas de: PCR (por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction), cultivo bacteriano, y casos muy particulares por ELISA (por sus siglas en inglés: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) y Checkerboard (**ver tabla 10**). Particularmente, considerando la técnica utilizada en el presente estudio, se cuantificaron 40 especies bacterianas por medio de la técnica Checkerboard para hibridación DNA-DNA, en un sólo ensayo de boca completa, en un estudio de tipo longitudinal, lo cual lo hace muy enriquecedor, ya que el resto de las técnicas mencionadas evalúan un número muy reducido de especies (periodontopatógenas en su mayoría).

La mayor limitación en el presente estudio fue que sólo se evaluó un sujeto de estudio. Sin embargo, como estudio piloto, nos abre las puertas para poder realizarlo a

futuro en un mayor número de sujetos mexicanos. Considerando que la periodontitis es una enfermedad cuyo control es difícil y su progresión puede ser rápida, el uso de un probiótico como coadyuvante puede influir benéficamente para el tratamiento periodontal de fase 1 (previo a entrar a fase quirúrgica). La terapia periodontal clásica para tratar la periodontitis se basa en el raspado y alisado radicular llevado a cabo de forma mecánica o ultrasónica con el fin de eliminar depósitos bacterianos, cálculo y cemento contaminado por bacterias y endotoxinas <sup>64</sup>. En la actualidad existen diferentes terapias coadyuvantes a la terapia periodontal, una es la antibioticoterapia<sup>34</sup>, sin embargo, las desventajas de usar antibióticos son: la resistencia antimicrobiana y la muerte no selectiva de bacterias benéficas y no benéficas en todo el organismo, adicionalmente, en México se tiene un consumo inadecuado de antibióticos con alta automedicación. Otra terapia coadyuvante es la terapia fotodinámica, donde se utiliza un agente foto-sensibilizante y una fuente lumínica calibrada a una longitud de onda específica en presencia de oxígeno denominado “ozono”, la cual consideran presentar mejoría en parámetros clínicos periodontales, comparado con la terapia periodontal convencional<sup>65</sup>. La aplicación del ozono <sup>66</sup>, reduce ciertas especies periodontopatógenas, sin embargo, no tiene beneficios clínicos adicionales. A diferencia de los probióticos, cualquier otra técnica coadyuvante no es selectiva en la efectividad bactericida. Concordante con el presente estudio, el probiótico *L. reuteri* ha mostrado mejoría en los parámetros clínicos de inflamación periodontal, así mismo, ha presentado la disminución selectiva de algunas especies periodontopatógenas de la microbiota, ya sea utilizado solo, o en conjunto con raspado y alisado radicular <sup>59</sup>. Por lo tanto, un futuro propósito



es el de profundizar en un estudio que incluyera tratamiento de fase 1 para reportar la modificación en la microbiota en una población mayor.

## CONCLUSIONES

Mientras la paciente del presente estudio consumió el probiótico, su microbiota se mantuvo con menores cuentas, prevalencia y proporción en el 40% de las cepas evaluadas, particularmente de especies patógenas reconocidas o putativas periodontales, mostrando efectividad antimicrobiana temporal, ya que la microbiota periodontopatógena se restituyó posterior a los tres meses del consumo del probiótico.

En cuanto a la relación de proporciones promedio por complejos bacterianos, se observó un aumento de especies benéficas periodontales y disminución de periodontopatógenas reconocidas y putativas, con lo cual podemos sugerir que, mientras la paciente consume el probiótico, se presenta homeostasis en la microbiota subgingival.

El uso del Checkerboard ofrece la posibilidad de evaluar de manera cuantitativa las especies representativas de la biopelícula dental. Este es el principio de un estudio que se pudiera ampliar y realizar de manera longitudinal, con más pacientes, con el fin de obtener resultados que fueran directamente aplicados en conjunto con la terapéutica periodontal de sujetos con periodontitis.

Actualmente, la severidad y riesgo de la periodontitis, se asocian a diferentes alteraciones metabólicas, sin embargo, la información obtenida de los pacientes en la consulta dental, derivan únicamente del interrogatorio en la historia clínica, la cual es mínima, por lo tanto, sugerimos solicitar a los pacientes que presenten datos clínicos relacionados con severidad y riesgo de las enfermedades periodontales, estudios clínicos

adicionales como glucosa plasmática en ayuno y bioquímica sanguínea, para descartar o corroborar que un factor de riesgo metabólico adicional que estuviera presente.

En cuanto a tratamiento periodontal, es indispensable realizar fase I en zonas con bolsas  $\geq 5\text{mm}$ , para poder eliminar el factor etiológico de la enfermedad, teniendo como meta la eliminación de la bolsa en orden de la disminución de bacterias, sin embargo, con un coadyuvante como el probiótico *L. reuteri*, se pudieran lograr mejores beneficios periodontales a corto plazo.

En cuanto a la zona con presencia de fístula en el diente 46, a pesar de que no se realizó el retratamiento de conductos, la lesión disminuyó durante la realización del estudio, sin embargo, no podemos discernir si la lesión presentó mejoría por el uso del probiótico, o porque se encontraba en estado crónico de la lesión endo-periodontal. En cuanto a la literatura se refiere, solo se encontró una tesis de maestría en la cual realizó un estudio in-vitro donde no obtuvieron resultados significativos en lesiones endodóncicas posteriores al uso de probióticos, lo cual representa un alcance a tratar en futuras investigaciones.

Los resultados del presente estudio, demostraron que el uso del probiótico *L. reuteri*, como coadyuvante en el tratamiento de las enfermedades periodontales, disminuye los parámetros clínicos de inflamación periodontal, por lo tanto, un tratamiento periodontal a base del control de placa, con el consumo del probiótico *L. reuteri*, puede ser de utilidad para evitar llegar a la fase quirúrgica del tratamiento periodontal, o al uso de coadyuvantes que eliminan de una forma menos selectiva las

especies de la placa dentobacteriana, como es la antibioticoterapia, fototerapia y el ozono.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. PAPAPANOU PN, SANZ M, BUDUNELI N, ET AL. PERIODONTITIS: CONSENSUS REPORT OF WORKGROUP 2 OF THE 2017 WORLD WORKSHOP ON THE CLASSIFICATION OF PERIODONTAL AND PERI-IMPLANT DISEASES AND CONDITIONS. JOURNAL OF PERIODONTOLOGY 2018;89:S173-S182.
2. Lang NP, Suvan JE, Tonetti MS. Risk factor assessment tools for the prevention of periodontitis progression a systematic review. Journal of clinical periodontology 2015;42:S59-S70.
3. ARMITAGE GC. PERIODONTAL DIAGNOSES AND CLASSIFICATION OF PERIODONTAL DISEASES. PERIODONTOLOGY 2000 2004;34:9-21.
4. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. Nature Reviews Immunology 2015;15:30.
5. TROMBELLI L, FARINA R, SILVA CO, TATAKIS DN. PLAQUE-INDUCED GINGIVITIS: CASE DEFINITION AND DIAGNOSTIC CONSIDERATIONS. JOURNAL OF CLINICAL PERIODONTOLOGY 2018;45:S44-S67.
6. CATON JG, ARMITAGE G, BERGLUNDH T, ET AL. A NEW CLASSIFICATION SCHEME FOR PERIODONTAL AND PERI-IMPLANT DISEASES AND CONDITIONS – INTRODUCTION AND KEY CHANGES FROM THE 1999 CLASSIFICATION. JOURNAL OF CLINICAL PERIODONTOLOGY 2018;45:S1-S8.
7. Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. J Bacteriol 1994;176:2137-2142.
8. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontology 2000 2005;38:135-187.
9. Socransky S, Haffajee A, Cugini M, Smith C, Kent Jr R. Microbial complexes in subgingival plaque. Journal of clinical periodontology 1998;25:134-144.
10. LINDHE J LN, KARING T. PERIODONTOLOGIA CLÍNICA E IMPLANTOLOGÍA ODONTOLÓGICA. BUENOS AIRES: MÉDICA PANAMERICANA; 2017: 317-323.
11. XIMENEZ-FYVIE LA, ALMAGUER-FLORES A, JACOBO-SOTO V, LARA-CORDOBA M, SANCHEZ-VARGAS LO, ALCANTARA-MARURI E. DESCRIPTION OF THE SUBGINGIVAL MICROBIOTA OF PERIODONTALLY UNTREATED MEXICAN SUBJECTS: CHRONIC PERIODONTITIS AND PERIODONTAL HEALTH. J PERIODONTOL 2006;77:460-471.
12. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Som S, Thompson M, Torresyap G, Socransky SS. The effect of repeated professional supragingival plaque removal on the composition of the supra- and subgingival microbiota. Journal of clinical periodontology 2000;27:637-647.
13. Slots J, Rams TE. New views on periodontal microbiota in special patient categories. Journal of clinical periodontology 1991;18:411-420.
14. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. Journal of periodontology 1992;63:322-331.
15. Socransky S, Smith C, Martin L, Paster B, Dewhirst F, Levin A. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. Biotechniques 1994;17:788-792.

16. Lee Y-K, Salminen S. The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science & TECHNOLOGY* 1995;6:241-245.
17. FULLER R, GIBSON GR. MODIFICATION OF THE INTESTINAL MICROFLORA USING PROBIOTICS AND PREBIOTICS. *SCANDINAVIAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY* 1997;32:28-31.
18. STAMATOVA I, MEURMAN JH. PROBIOTICS AND PERIODONTAL DISEASE. *PERIODONTOLOGY* 2000 2009;51:141-151.
19. METCHNIKOFF II. *THE PROLONGATION OF LIFE: OPTIMISTIC STUDIES*: SPRINGER PUBLISHING COMPANY; 2004.
20. LILLY DM, STILLWELL RH. PROBIOTICS: GROWTH-PROMOTING FACTORS PRODUCED BY MICROORGANISMS. *SCIENCE* 1965;147:747-748.
21. TEUGHEL W, LOOZEN G, QUIRYNEN M. DO PROBIOTICS OFFER OPPORTUNITIES TO MANIPULATE THE PERIODONTAL ORAL MICROBIOTA? *JOURNAL OF CLINICAL PERIODONTOLOGY* 2011;38 SUPPL 11:159-177.
22. TEUGHEL W, VAN ESSCHE M, SLIEPEN I, QUIRYNEN M. PROBIOTICS AND ORAL HEALTHCARE. *PERIODONTOL* 2000 2008;48:111-147.
23. YANINE N, ARAYA I, BRIGNARDELLO-PETERSEN R, ET AL. EFFECTS OF PROBIOTICS IN PERIODONTAL DISEASES: A SYSTEMATIC REVIEW. *CLINICAL ORAL INVESTIGATIONS* 2013;17:1627-1634.
24. ISHIKAWA H, AKEDO I, UMESAKI Y, TANAKA R, IMAOKA A, OTANI T. RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL OF THE EFFECT OF BIFIDOBACTERIA-FERMENTED MILK ON ULCERATIVE COLITIS. *JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF NUTRITION* 2003;22:56-63.
25. KOEBNICK C, WAGNER I, LEITZMANN P, STERN U, ZUNFT H. PROBIOTIC BEVERAGE CONTAINING LACTOBACILLUS CASEI SHIROTA IMPROVES GASTROINTESTINAL SYMPTOMS IN PATIENTS WITH CHRONIC CONSTIPATION. *CANADIAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY* 2003;17:655-659.
26. Marteau PR, Vrese Md, Cellier CJ, Schrezenmeir J. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *The American journal of clinical nutrition* 2001;73:430s-436s.
27. Laleman I, Yilmaz E, Ozcelik O, et al. The effect of a streptococci containing probiotic in periodontal therapy: a randomized controlled trial. *Journal of clinical periodontology* 2015.
28. Meurman JH. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *European journal of oral sciences* 2005;113:188-196.
29. Caglar E, Kavaloglu Cildir S, Ergeneli S, Sandalli N, Twetman S. Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets. *Acta Odontologica Scandinavica* 2006;64:314-318.
30. Bonifait L, Chandad F, Grenier D. Probiotics for oral health: myth or reality? *Journal of the Canadian Dental Association* 2009;75.
31. NASE L, HATAKKA K, SAVILAHTI E, ET AL. EFFECT OF LONG-TERM CONSUMPTION OF A PROBIOTIC BACTERIUM, LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG, IN MILK ON DENTAL CARIES AND CARIES RISK IN CHILDREN. *CARIES RES* 2001;35:412-420.
32. HATAKKA K, AHOLA AJ, YLI-KNUUTILA H, ET AL. PROBIOTICS REDUCE THE PREVALENCE OF ORAL CANDIDA IN THE ELDERLY--A RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL. *J DENT RES* 2007;86:125-130.

33. HASSLÖF P, HEDBERG M, TWETMAN S, STECKSÉN-BLICKS C. GROWTH INHIBITION OF ORAL MUTANS STREPTOCOCCI AND CANDIDA BY COMMERCIAL PROBIOTIC LACTOBACILLI-AN IN VITRO STUDY. *BMC ORAL HEALTH* 2010;10:18.
34. Haffajee AD, Teles RP, Socransky SS. The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. *Periodontol 2000* 2006;42:219-258.
35. Goodson JM, Haffajee AD, Socransky SS, et al. Control of periodontal infections: a randomized controlled trial I. The primary outcome attachment gain and pocket depth reduction at treated sites. *Journal of clinical periodontology* 2012;39:526-536.
36. Teles F, Teles R, Uzel N, et al. Early microbial succession in redeveloping dental biofilms in periodontal health and disease. *Journal of periodontal research* 2012;47:95-104.
37. Magnusson I, Lindhe J, Yoneyama T, Liljenberg B. Recolonization of a subgingival microbiota following scaling in deep pockets. *Journal of clinical periodontology* 1984;11:193-207.
38. Staab B, Eick S, Knöfler G, Jentsch H. The influence of a probiotic milk drink on the development of gingivitis: a pilot study. *Journal of clinical periodontology* 2009;36:850-856.
39. Maekawa T, Hajishengallis G. Topical treatment with probiotic *Lactobacillus brevis* CD 2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss. *Journal of periodontal research* 2014;49:785-791.
40. Iwamoto T, Suzuki N, Tanabe K, Takeshita T, Hirofuji T. Effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* WB21 on halitosis and oral health: an open-label pilot trial. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;110:201-208.
41. Twetman S, Derawi B, Keller M, Ekstrand K, Yucel-Lindberg T, Stecksén-Blicks C. Short-term effect of chewing gums containing probiotic *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. *Acta Odontologica Scandinavica* 2009;67:19-24.
42. KRASSE P, CARLSSON B, DAHL C, PAULSSON A, NILSSON A, SINKIEWICZ G. DECREASED GUM BLEEDING AND REDUCED GINGIVITIS BY THE PROBIOTIC LACTOBACILLUS REUTERI. *SWED DENT J* 2006;30:55-60.
43. VIVEKANANDA MR, VANDANA KL, BHAT KG. EFFECT OF THE PROBIOTIC LACTOBACILLI REUTERI (PRODENTIS) IN THE MANAGEMENT OF PERIODONTAL DISEASE: A PRELIMINARY RANDOMIZED CLINICAL TRIAL. *J ORAL MICROBIOL* 2010;2.
44. TEKCE M, INCE G, GURSOY H, ET AL. CLINICAL AND MICROBIOLOGICAL EFFECTS OF PROBIOTIC LOZENGES IN THE TREATMENT OF CHRONIC PERIODONTITIS: A 1-YEAR FOLLOW-UP STUDY. *JOURNAL OF CLINICAL PERIODONTOLOGY* 2015;42:363-372.
45. TALARICO TL, DOBROGOSZ WJ. CHEMICAL CHARACTERIZATION OF AN ANTIMICROBIAL SUBSTANCE PRODUCED BY LACTOBACILLUS REUTERI. *ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER* 1989;33:674-679.
46. HAFFAJEE AD, SOCRANSKY SS, LINDHE J. COMPARISON OF STATISTICAL METHODS OF ANALYSIS OF DATA FROM CLINICAL PERIODONTAL TRIALS. *JOURNAL OF CLINICAL PERIODONTOLOGY* 1983;10:247-256.
47. LOVEGROVE JM. DENTAL PLAQUE REVISITED: BACTERIA ASSOCIATED WITH PERIODONTAL DISEASE. *JOURNAL OF THE NEW ZEALAND SOCIETY OF PERIODONTOLOGY* 2004:7-21.
48. FEINBERG AP, VOGELSTEIN B. A TECHNIQUE FOR RADIOLABELING DNA RESTRICTION ENDONUCLEASE FRAGMENTS TO HIGH SPECIFIC ACTIVITY. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* 1983;132:6-13.

49. ENGLER-BLUM G, MEIER M, FRANK J, MULLER GA. REDUCTION OF BACKGROUND PROBLEMS IN NONRADIOACTIVE NORTHERN AND SOUTHERN BLOT ANALYSES ENABLES HIGHER SENSITIVITY THAN 32P-BASED HYBRIDIZATIONS. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* 1993;210:235-244.
50. Socransky SS, Haffajee AD. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. *J Periodontal Res* 1991;26:195-212.
51. Sinkiewicz G, Cronholm S, Ljunggren L, Dahlen G, Bratthall G. Influence of dietary supplementation with *Lactobacillus reuteri* on the oral flora of healthy subjects. *Swed Dent J* 2010;34:197-206.
52. Vicario M, Santos A, Violant D, Nart J, Giner L. Clinical changes in periodontal subjects with the probiotic *Lactobacillus reuteri* Prodentis: a preliminary randomized clinical trial. *Acta Odontol Scand* 2013;71:813-819.
53. Kinane D, Stathopoulou P, Papapanou P. Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers* 2017;3:17038.
54. Jepsen S, Caton JG, Albandar JM, et al. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of clinical periodontology* 2018;45 Suppl 20:S219-s229.
55. Sunitha VR, Emmadi P, Namasivayam A, Thyegarajan R, Rajaraman V. The periodontal - endodontic continuum: A review. *Journal of conservative dentistry : JCD* 2008;11:54-62.
56. Mayanagi G, Kimura M, Nakaya S, et al. 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* 2009;36:506-513.
57. Koll P, Mandar R, Marcotte H, Leibur E, Mikelsaar M, Hammarstrom L. Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:139-147.
58. Iniesta M, Herrera D, Montero E, et al. Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus reuteri*-containing tablets on the subgingival and salivary microbiota in patients with gingivitis. A randomized clinical trial. *Journal of clinical periodontology* 2012;39:736-744.
59. TEUGHEL W, DURUKAN A, OZCELIK O, PAUWELS M, QUIRYNEN M, HAYTAC MC. CLINICAL AND MICROBIOLOGICAL EFFECTS OF LACTOBACILLUS REUTERI PROBIOTICS IN THE TREATMENT OF CHRONIC PERIODONTITIS: A RANDOMIZED PLACEBO-CONTROLLED STUDY. *JOURNAL OF CLINICAL PERIODONTOLOGY* 2013;40:1025-1035.
60. HAFFAJEE AD, CUGINI MA, DIBART S, SMITH C, KENT RL, JR., SOCRANSKY SS. THE EFFECT OF SRP ON THE CLINICAL AND MICROBIOLOGICAL PARAMETERS OF PERIODONTAL DISEASES. *JOURNAL OF CLINICAL PERIODONTOLOGY* 1997;24:324-334.
61. THURNHEER T, KARYGIANNI L, FLURY M, BELIBASAKIS GN. FUSOBACTERIUM SPECIES AND SUBSPECIES DIFFERENTIALLY AFFECT THE COMPOSITION AND ARCHITECTURE OF SUPRA- AND SUBGINGIVAL BIOFILMS MODELS. *FRONTIERS IN MICROBIOLOGY* 2019;10:1716.
62. SLOTS J, TAUBMAN MA. CONTEMPORARY ORAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY: MOSBY YEAR BOOK; 1992.



63. Rodríguez-Hernández AP, Márquez-Corona ML, Pontigo-Loyola AP, Medina-Solís CE. Subgingival Microbiota of Mexicans with Type 2 Diabetes with Different Periodontal and Metabolic Conditions. 2019;16.
64. Ryder M, Armitage G. Minimally invasive periodontal therapy for general practitioners. *Periodontology 2000* 2016;71:7-9.
65. Cid M F, Jara J J, Huerta C L, Oliva M P. Eficacia de Terapia Fotodinámica como Complemento de Terapia Convencional Periodontal Versus Terapia Convencional en el Tratamiento de Pacientes Adultos con Periodontitis Crónica: Una Revisión Sistemática con Metaanálisis. *International journal of odontostomatology* 2016;10:315-323.
66. Uraz A, Karaduman B, Isler SC, Gonen S, Cetiner D. Ozone application as adjunctive therapy in chronic periodontitis: Clinical, microbiological and biochemical aspects. *Journal of dental sciences* 2019;14:27-37.

## TABLAS

**Tabla 1.** Criterios de exclusión.

Grupo	Edad	No. de dientes	Nivel de inserción	Criterios de exclusión
Paciente con PG	≥30 años	≥20	≥ 8 sitios ≥ 5mm	Mexicano por nacimiento y con ascendencia de padre y por lo menos 2 abuelos mexicanos Sin tratamiento periodntal previo Sin embarazo o lactancia No fumador Sin enfermedades sistémicas Sin toma de antibiótico (3 meses)

**PCG:** Periodontitis crónica generalizada

**Tabla 2.** Listado de las 40 cepas de referencia empleadas para la elaboración de sondas de DNA

Especie	ATCC	Complejo	Especie	ATCC	Complejo
<i>Actinomyces georgiae</i>	49285	Azul	<i>Neisseria mucosa</i>	19696	Otros
<i>Actinomyces israelii</i>	12102	Azul	<i>Parvimonas micra</i>	33270	Naranja
<i>Actinomyces naeslundii</i>	12104	Azul	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	35406	Otros
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929	Morado	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277	Otros
<i>Actinomyces viscosus</i>	43146	Azul	<i>Prevotella intermedia</i>	25611	Naranja
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> stp.b	43718	No-agrupado	<i>Prevotella loescheii</i>	15930	Otros
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236	Naranja	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845	Otros
<i>Campylobacter rectus</i>	33238	Naranja	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563	Naranja
<i>Campylobacter showae</i>	51146	Naranja	<i>Propionibacterium acnes</i>	6919	Otros
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624	Verde	<i>Selenomonas noxia</i>	43541	No-agrupado
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	27872	Verde	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397	Amarillo
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612	Verde	<i>Streptococcus constellatus</i>	27823	Naranja
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	14266	Otros	<i>Streptococcus gordonii</i>	10558	Amarillo
<i>Eikenella corrodens</i>	23834	Verde	<i>Streptococcus intermedius</i>	27335	Amarillo
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099	Naranja	<i>Streptococcus mitis</i>	49456	Amarillo
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271	Otros	<i>Streptococcus oralis</i>	35037	Amarillo
<i>Filifactor alocis</i>	35896	Otros	<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556	Amarillo
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i>	25586	Naranja	<i>Tannerella forsythia</i>	43037	Rojo
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693	Naranja	<i>Treponema denticola</i>	35405	Rojo
<i>Gemella morbillorum</i>	27824	Rojo	<i>Veillonella parvula</i>	10790	Morado

Las especies se presentan en orden alfabético. **ATCC:** Número de referencia del American Type Culture Collection (Rockville, MD, EU). **Complejo:** Las especies fueron agrupadas lo más similarmente posible a la descripción de complejos microbianos en la placa dentobacteriana subgingival<sup>8,9</sup> con la siguiente excepción: *C. matruchotii*, *E. saburreum*, *F. alocis*, *G. morbillorum*, *N. mucosa*, *P. endodontalis*, *P. loescheii*, *P. melaninogenica* y *P. acnes* se encuentran agrupados como "Otros".

**Tabla 3.** Características generales del sujeto de estudio

Características generales	Tiempo			
	0	1 mes	3 meses	12 meses
Fecha visita	13-ene-16	25-feb-16	06-abr-16	14-jun-17
Género	Femenino			
Edad	35		36	
Antibiótico meses	0	0	0	0
Fumador actual	0	0	0	0
# Dientes presentes	23	23	23	23
Consumo probióticos (meses previo visita)	0	1	0	0
Tratamiento previo visita	Profiláxis	Ninguno	Ninguno	Ninguno

**Tabla 4a.** Características periodontales del sujeto de estudio.

Tiempo	T0		T1 mes		T3 meses		T12 meses	
	Media	± EEM	Media	± EEM	Media	± EEM	Media	± EEM
Profundidad de bolsa (PB mm)	4,09	0,37	3,57	0,38	3,85	0,39	3,28	0,35
Nivel de Inserción (NI mm)	2,13	0,28	1,63	0,20	2,20	0,28	1,52	0,24
Número de sitios con NI ≥5 (%)	13,04	0,07	4,35	0,04	8,70	0,06	4,35	0,04
Placa (PLA %) *	21,74	0,09	30,43	0,10	69,57	0,10	39,13	0,10
Enrojecimiento (ENR %) **, ***	60,87	0,10	56,52	0,11	100	0,00	34,78	0,10
Sangrado al Sondeo (SS %) *	13,04	0,07	39,13	0,10	52,17	0,11	17,39	0,08
Supuración (SUP %)	4,35	0,04	4,35	0,04	0,00	0,00	13,04	0,07

**EEM:** Error estándar de la media.

**Tabla 4b.** Características periodontales del sujeto de estudio

Parámetro	U-Mann Whitney						
	KW	T0 vs T1	T0 vs T3	T0 vs T12	T1 vs T3	T1 vs T12	T3 vs T12
Profundidad de bolsa (PB mm)							
Nivel de Inserción (NI mm)							
Número de sitios con NI ≥5							
Placa (PLA %) *			*				
Enrojecimiento (ENR %) **, ***	***		**		**		***
Sangrado al Sondeo (SS %) *			*				
Supuración (SUP %)							

**KW:** Prueba de Kruskal Wallis y **U-M:** U de Mann Whitney en comparaciones pareadas, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ , con ajuste de comparaciones múltiples. T0: Tiempo 0, T1: 1 mes, T3: 3 meses y T12: 12 meses.

**Tabla 5a.** Niveles promedio (cuentas bacterianas x 10<sup>5</sup> ± EEM) de las 40 especies bacterianas evaluadas en las 92 muestras del paciente de estudio.

Cuentas totales x10 <sup>5</sup>	T0		T1		T3		T12	
	Media	± EEM	Media	± EEM	Media	± EEM	Media	± EEM
<i>A. georgiae</i>	1.13	0.41	0.96	0.34	1.00	0.28	1.63	0.36
<i>A. israelii</i>	2.41	0.70	2.07	0.51	2.32	0.50	3.50	0.76
<i>A. naeslundii</i>	4.87	0.86	4.41	0.68	1.59	0.45	2.32	0.40
<i>A. viscosus</i>	5.31	0.94	5.64	0.81	3.31	0.67	3.26	0.51
<i>S. anginosus</i>	2.78	0.74	1.77	0.50	2.96	0.65	3.94	0.89
<i>S. gordonii</i>	5.29	0.74	2.21	0.60	4.89	0.97	5.30	0.70
<i>S. intermedius</i>	3.74	0.79	3.53	0.61	8.18	1.14	8.01	1.21
<i>S. mitis</i>	4.24	0.74	2.45	0.53	4.32	0.87	3.91	0.68
<i>S. oralis</i>	0.92	0.40	1.24	0.38	1.85	0.55	1.93	0.52
<i>S. sanguinis</i>	1.95	0.62	1.83	0.45	2.35	0.70	5.61	1.17
<i>A. odontolyticus</i>	1.56	0.50	2.97	0.83	5.89	1.05	7.87	1.38
<i>V. parvula</i>	4.99	1.09	5.01	0.78	11.36	1.98	2.59	0.75
<i>C. gingivalis</i>	2.17	0.46	2.89	0.54	4.42	0.76	2.83	0.59
<i>C. ochracea</i>	0.50	0.25	1.65	0.47	1.63	0.44	1.29	0.44
<i>C. sputigena</i>	0.75	0.31	3.18	0.75	4.97	0.98	1.04	0.44
<i>E. corrodens</i>	1.47	0.46	1.47	0.48	1.54	0.56	1.26	0.40
<i>C. gracilis</i>	3.07	0.61	2.97	0.73	3.13	1.14	5.65	0.99
<i>C. rectus</i>	0.63	0.39	2.39	0.67	1.32	0.54	1.14	0.47
<i>C. showae</i>	0.83	0.32	2.33	0.65	4.48	0.92	5.23	0.95
<i>E. nodatum</i>	0.91	0.38	0.87	0.33	2.73	0.51	2.83	0.56
<i>F. nucleatum</i>	3.07	0.72	5.05	1.05	6.62	1.60	4.60	0.84
<i>F. periodonticum</i>	1.55	0.50	4.14	0.79	9.29	1.34	5.19	0.90
<i>P. micra</i>	8.47	0.73	4.52	0.75	14.37	2.74	5.66	0.98
<i>P. intermedia</i>	4.20	0.96	6.70	1.75	9.38	1.86	8.50	1.21
<i>P. nigrescens</i>	4.67	0.82	7.33	1.40	11.32	1.52	13.06	1.97
<i>S. constellatus</i>	2.29	0.66	2.31	0.54	2.55	0.81	5.86	1.01
<i>P. gingivalis</i>	2.79	0.76	6.20	1.15	6.15	1.56	11.95	1.67
<i>T. forsythia</i>	5.01	0.68	4.90	1.23	9.12	1.56	6.33	1.10
<i>T. denticola</i>	2.91	0.79	4.20	1.05	10.44	1.74	9.72	1.42
<i>A. a. b</i>	0.69	0.36	2.37	0.67	3.19	0.89	3.39	0.67
<i>S. noxia</i>	4.39	0.76	3.48	0.89	5.00	0.82	1.57	0.45
<i>C. matruchotii</i>	4.89	0.82	6.01	1.08	10.17	1.66	6.02	0.99
<i>E. saburreum</i>	5.48	0.66	5.06	0.95	5.46	1.29	4.81	0.74
<i>F. alocis</i>	5.52	1.12	9.48	1.94	9.34	1.45	10.72	1.39
<i>P. endodontalis</i>	3.30	0.70	2.47	0.65	5.73	1.26	3.73	0.73
<i>N. mucosa</i>	0.64	0.33	2.54	0.68	1.37	0.63	0.72	0.32
<i>G. morbillorum</i>	0.62	0.25	2.03	0.50	2.85	0.67	0.63	0.28
<i>P. loescheii</i>	0.71	0.49	4.28	0.94	3.63	1.16	5.71	1.09
<i>P. melaninog.</i>	1.67	0.52	1.97	0.60	3.14	0.75	1.79	0.68
<i>P. acnes</i>	2.73	0.49	1.57	0.35	1.50	0.36	1.35	0.35

**Media:** %de sitios con cuentas totales x10<sup>5</sup> de cada especie bacteriana. **EMM:** Error Estándar de la media. **A.a.b:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* stp. b. T0: Tiempo 0, T1: 1 mes, T3: 3 meses y T12: 12 meses.

**Tabla 5b.** Pruebas estadísticas entre cuentas individuales promedio por tiempos de estudio.

Cuentas	U-Mann Whitney						
	KW	T0 vs T1	T0 vs T3	T0 vs T12	T1 vs T3	T1 vs T12	T3 vs T12
<i>P. loescheii</i>	**	**		***			
<i>P. gingivalis</i>	*			**			
<i>P. micra</i>		*					
<i>V. parvula</i>	*						*
<i>S. sanguinis</i>	*			*			
<i>S. intermedius</i>	*						
<i>T. denticola</i>	**		*	**			
<i>P. nigrescens</i>				*			
<i>A. odontolyticus</i>	***		**	**			
<i>C. showae</i>	**		*	***			
<i>E. nodatum</i>	**			*		*	
<i>F. periodonticum</i>	***		***	**			
<i>G. morbillorum</i>	**						*
<i>C. sputigena</i>	**		*				*

**KW:** Prueba de Kruskal Wallis y **U-M:** U de Mann Whitney en comparaciones pareadas, \*  $p < 0.05$ , \*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ , con ajuste de comparaciones múltiples. T0: Tiempo 0, T1: 1 mes, T3: 3 meses y T12: 12 meses.

**Tabla 6a.** Prevalencia promedio (% sitios colonizados  $\pm$  EEM) de las 40 especies bacterianas evaluadas en las 92 muestras del paciente de estudio.

% de sitios colonizados	T0		T1		T3		T12	
	Media	$\pm$ EEM	Media	$\pm$ EEM	Media	$\pm$ EEM	Media	$\pm$ EEM
<i>A. georgiae</i>	34.8	0.10	43.5	0.11	52.2	0.11	100.0	0.00
<i>A. israelii</i>	39.1	0.10	56.5	0.11	60.9	0.10	69.6	0.10
<i>A. naeslundii</i>	69.6	0.10	82.6	0.08	47.8	0.11	78.3	0.09
<i>A. viscosus</i>	69.6	0.10	87.0	0.07	65.2	0.10	78.3	0.09
<i>S. anginosus</i>	52.2	0.11	60.9	0.10	60.9	0.10	65.2	0.10
<i>S. gordonii</i>	78.3	0.09	65.2	0.10	78.3	0.09	87.0	0.07
<i>S. intermedius</i>	56.5	0.11	78.3	0.09	87.0	0.07	87.0	0.07
<i>S. mitis</i>	73.9	0.09	82.6	0.08	78.3	0.09	87.0	0.07
<i>S. oralis</i>	26.1	0.09	56.5	0.11	56.5	0.11	60.9	0.10
<i>S. sanguinis</i>	39.1	0.10	56.5	0.11	56.5	0.11	100.0	0.00
<i>A. odontolyticus</i>	56.5	0.11	60.9	0.10	95.7	0.04	100.0	0.00
<i>V. parvula</i>	82.6	0.08	95.7	0.04	87.0	0.07	69.6	0.10
<i>C. gingivalis</i>	69.6	0.10	82.6	0.08	100.0	0.00	78.3	0.09
<i>C. ochracea</i>	17.4	0.08	56.5	0.11	56.5	0.11	52.2	0.11
<i>C. sputigena</i>	30.4	0.10	73.9	0.09	73.9	0.09	30.4	0.10
<i>E. corrodens</i>	56.5	0.11	47.8	0.11	56.5	0.11	47.8	0.11
<i>C. gracilis</i>	69.6	0.10	60.9	0.10	34.8	0.10	65.2	0.10
<i>C. rectus</i>	13.0	0.07	52.2	0.11	34.8	0.10	30.4	0.10
<i>C. showae</i>	47.8	0.11	60.9	0.10	78.3	0.09	100.0	0.00
<i>E. nodatum</i>	30.4	0.10	39.1	0.10	73.9	0.09	91.3	0.06
<i>F. nucleatum</i>	69.6	0.10	69.6	0.10	65.2	0.10	69.6	0.10
<i>F. periodonticum</i>	56.5	0.11	91.3	0.06	95.7	0.04	100.0	0.00
<i>P. micra</i>	100.0	0.00	91.3	0.06	65.2	0.10	87.0	0.07
<i>P. intermedia</i>	52.2	0.11	65.2	0.10	73.9	0.09	100.0	0.00
<i>P. nigrescens</i>	87.0	0.07	91.3	0.06	95.7	0.04	100.0	0.00
<i>S. constellatus</i>	43.5	0.11	60.9	0.10	39.1	0.10	73.9	0.09
<i>P. gingivalis</i>	52.2	0.11	78.3	0.09	56.5	0.11	87.0	0.07
<i>T. forsythia</i>	91.3	0.06	69.6	0.10	87.0	0.07	91.3	0.06
<i>T. denticola</i>	65.2	0.10	73.9	0.09	100.0	0.00	100.0	0.00
<i>A. a. b</i>	17.4	0.08	52.2	0.11	43.5	0.11	60.9	0.10
<i>S. noxia</i>	82.6	0.08	60.9	0.10	82.6	0.08	47.8	0.11
<i>C. matruchotii</i>	82.6	0.08	73.9	0.09	73.9	0.09	91.3	0.06
<i>E. sabuneum</i>	95.7	0.04	69.6	0.10	60.9	0.10	91.3	0.06
<i>F. allos</i>	65.2	0.10	60.9	0.10	82.6	0.08	87.0	0.07
<i>P. endodontalis</i>	60.9	0.10	60.9	0.10	60.9	0.10	69.6	0.10
<i>N. mucosa</i>	26.1	0.09	52.2	0.11	30.4	0.10	34.8	0.10
<i>G. morbillorum</i>	34.8	0.10	82.6	0.08	73.9	0.09	30.4	0.10
<i>P. loescheii</i>	13.0	0.07	69.6	0.10	52.2	0.11	82.6	0.08
<i>P. melaninog.</i>	47.8	0.11	52.2	0.11	65.2	0.10	47.8	0.11
<i>P. acnes</i>	82.6	0.08	65.2	0.10	65.2	0.10	65.2	0.10

**EEM:** Error Estándar de la Media, **A.a. b.** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sp. b T0: Tiempo 0, T1: 1 mes, T3: 3 meses y T12: 12 meses



**Tabla 6b.** Pruebas estadísticas

Prevalencia	KW	T0 vs T1	T0 vs T3	T0 vs T12	T1 vs T3	T1 vs T12	T3 vs T12
<i>S. sanguinis</i>	**			***		*	*
<i>A. georgiae</i>	**			***		**	**
<i>T. denticola</i>	*						
<i>A. odontolyticus</i>	**			*		**	
<i>C. showae</i>	*			**		*	
<i>E. nodatum</i>	**			**		**	
<i>F. periodonticum</i>	**			*			
<i>G. morbillorum</i>	**	*				*	
<i>C. sputigena</i>	*						

**KW:** Prueba de Kruskal Wallis y **U-M:** U de Mann Whitney en comparaciones pareadas, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ , con ajuste de comparaciones múltiples. T0: Tiempo 0, T1: 1 mes, T3: 3 meses y T12: 12 meses

**Tabla 7a.** Proporción promedio (porcentaje del total de las cuentas de las sondas DNA) de las 40 especies bacterianas evaluadas en las 92 muestras del sujeto de estudio

Proporción %	T0		T1		T3		T12	
	Media	± EEM	Media	± EEM	Media	± EEM	Media	± EEM
<i>A. georgiae</i>	0.54	0.19	0.37	0.12	0.33	0.09	0.67	0.11
<i>A. israelii</i>	1.23	0.35	1.11	0.31	0.83	0.17	1.37	0.28
<i>A. naeslundii</i>	4.59	1.20	6.06	1.76	0.73	0.29	3.54	1.43
<i>A. viscosus</i>	4.97	1.13	8.49	2.82	1.75	0.51	3.47	1.14
<i>S. anginosus</i>	1.71	0.44	0.76	0.17	0.98	0.18	1.56	0.30
<i>S. gordonii</i>	4.75	0.83	1.09	0.22	1.90	0.28	3.05	0.48
<i>S. intermedius</i>	3.01	0.67	3.34	0.77	4.50	0.89	4.36	0.66
<i>S. mitis</i>	3.42	0.70	1.38	0.16	1.59	0.25	1.96	0.35
<i>S. oralis</i>	0.43	0.20	0.54	0.14	0.53	0.13	0.78	0.22
<i>S. sanguinis</i>	1.14	0.36	0.90	0.18	0.71	0.18	2.68	0.30
<i>A. odontolyticus</i>	0.76	0.19	1.55	0.42	4.79	1.38	3.79	0.32
<i>V. parvula</i>	4.05	0.90	5.37	1.65	6.29	1.30	1.31	0.30
<i>C. gingivalis</i>	1.67	0.36	1.96	0.30	3.25	0.99	1.51	0.38
<i>C. ochracea</i>	0.19	0.10	0.88	0.32	0.54	0.13	0.47	0.16
<i>C. sputigena</i>	0.52	0.21	1.66	0.30	1.94	0.37	0.31	0.13
<i>E. corrodens</i>	1.17	0.39	1.05	0.40	0.65	0.26	0.52	0.15
<i>C. gracilis</i>	3.20	0.84	3.28	0.91	0.80	0.28	2.37	0.43
<i>C. rectus</i>	0.21	0.13	1.01	0.24	0.36	0.14	0.34	0.13
<i>C. showae</i>	0.41	0.12	1.07	0.27	1.59	0.22	2.59	0.22
<i>E. nodatum</i>	0.37	0.14	0.30	0.09	1.04	0.16	1.31	0.14
<i>F. nucleatum</i>	2.19	0.44	2.74	0.51	2.08	0.44	1.93	0.36
<i>F. periodonticum</i>	0.84	0.20	2.85	0.50	5.23	0.59	3.17	0.46
<i>P. micra</i>	9.52	0.96	4.06	0.63	5.53	1.12	3.32	0.64
<i>P. intermedia</i>	6.12	2.19	4.09	1.09	5.32	1.36	6.30	1.25
<i>P. nigrescens</i>	4.94	1.00	7.49	2.14	11.53	3.29	7.47	0.56
<i>S. constellatus</i>	1.23	0.31	1.11	0.23	0.74	0.22	2.48	0.43
<i>P. gingivalis</i>	3.57	1.31	3.94	0.61	2.97	0.96	7.46	1.52
<i>T. forsythia</i>	5.43	0.77	2.51	0.49	4.12	0.81	3.94	0.89
<i>T. denticola</i>	2.21	0.48	2.13	0.36	5.16	0.46	5.49	0.52
<i>A. a. b</i>	0.26	0.13	1.14	0.32	0.92	0.24	1.37	0.26
<i>S. noxia</i>	3.32	0.41	2.15	0.75	2.32	0.40	0.51	0.13
<i>C. matruchotii</i>	4.31	0.75	5.09	1.40	5.21	1.14	4.20	0.99
<i>E. saburreum</i>	5.42	0.64	3.08	0.52	1.87	0.38	2.62	0.32
<i>F. alocis</i>	5.19	1.26	5.84	1.42	5.24	1.35	5.87	0.84
<i>P. endodontalis</i>	3.02	0.96	1.21	0.26	2.01	0.40	1.77	0.39
<i>N. mucosa</i>	0.48	0.28	2.39	1.02	0.61	0.27	0.27	0.10
<i>G. morbillorum</i>	0.35	0.13	1.60	0.37	1.03	0.17	0.19	0.08
<i>P. loescheii</i>	0.23	0.16	2.60	0.61	1.46	0.45	2.49	0.35
<i>P. melaninog.</i>	0.93	0.25	0.89	0.24	1.08	0.24	0.64	0.20
<i>P. acnes</i>	2.10	0.28	0.94	0.18	0.48	0.09	0.52	0.13

**EEM:** Error Estándar de la Media, **A.a. b.** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* stp. b T0: Tiempo 0, T1: 1 mes, T3: 3 meses y T12: 12 meses

**Tabla 7b.** Pruebas estadísticas de la proporción promedio por tiempos de estudio

Proporción	U-Mann Whitney						
	KW	T0 vs T1	T0 vs T3	T0 vs T12	T1 vs T3	T1 vs T12	T3 vs T12
<i>A. naeslundii</i>	*				**		
<i>P. loescheii</i>	***	**		***			
<i>A. a. b_prop</i>				*			
<i>E. saburreum</i>	**		***	**			
<i>P. micra</i>	**	**		***			
<i>V. parvula</i>	*					**	*
<i>S. sanguinis</i>	***			*		***	***
<i>T. denticola</i>	***		*	**	***	***	
<i>A. odontolyticus</i>	***		***	***		**	
<i>C. showae</i>	***		**	***		**	
<i>E. nodatum</i>	***			**	*	***	
<i>F. periodonticum</i>	***	**	***	***	*		*
<i>S. gordonii</i>	**	*				**	
<i>S. noxia</i>	***			*			**
<i>P. acnes</i>	**		**	**			
<i>G. morbillorum</i>	***	*				**	*
<i>C. sputigena</i>	**					*	**

**KW:** Prueba de Kruskal Wallis y **U-M:** U de Mann Whitney en comparaciones pareadas, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ , con ajuste de comparaciones múltiples. T0: Tiempo 0, T1: 1 mes, T3: 3 meses y T12: 12 meses

**Tabla 8a.** Proporciones promedio (% de cuentas bacterianas totales  $\pm$  EEM) de complejos bacterianos en las muestras de placa dentobacteriana subgingival.

Clave complejo	Complejo	T0		T1		T3		T12	
		Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM
1	Actinomyces sp. **	11.33	2.34	16.02	4.43	3.64	0.88	9.05	2.37
2	Amarillo **	14.46	2.01	7.99	1.07	10.20	1.32	14.39	1.46
3	Morado ***	4.80	0.93	6.92	1.60	11.08	1.48	5.10	0.42
4	Verde *	3.54	0.60	5.54	0.95	6.38	1.00	2.82	0.52
5	Naranja	29.04	3.46	28.01	3.33	34.22	3.23	31.30	1.29
6	Rojo *	11.21	1.77	8.59	1.23	12.26	2.08	16.89	2.26
7	No-agrupado	3.58	0.43	3.29	0.77	3.24	0.45	1.87	0.33
8	Otros	22.03	1.86	23.64	2.35	18.98	1.88	18.58	1.26

**EEM:** Error Estándar de la Media. T0: Tiempo 0, T1: 1 mes, T3: 3 meses y T12: 12 meses. 1-8 **Complejos bacterianos:** Las especies fueron agrupadas lo más similarmente posible a la descripción de complejos microbianos en la placa dentobacteriana subgingival <sup>8,9</sup>, representadas con un color de acuerdo con la tabla 2.

**Tabla 8b.** Pruebas estadísticas de las proporciones promedio por complejos bacterianos por tiempos de estudio

Complejo	KW	T0 vs T1	T0 vs T3	T0 vs T12	T1 vs T3	T1 vs T12	T3 vs T12
Actinomyces sp.	*				**		
Amarillo	*					**	
Morado	***		**		**		***
Verde							*
Rojo						*	
No-agrupado				*			

**KW:** Prueba de Kruskal Wallis y **U-M:** U de Mann Whitney en comparaciones pareadas, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ , con ajuste de comparaciones múltiples. T0: Tiempo 0, T1: 1 mes, T3: 3 meses y T12: 12 meses

**Tabla 9.** Proporciones promedio (% de cuentas bacterianas totales) de las 40 especies bacterianas evaluadas en la muestra del diente 46

Proporción %	T0	T1	T3	T12
<i>A. georgiae</i>	11.53	6.95	0.00	25.49
<i>A. israelii</i>	0.00	0.00	0.81	0.00
<i>A. naeslundii</i>	0.00	3.58	3.87	0.00
<i>A. viscosus</i>	15.81	2.49	4.11	1.80
<i>S. anginosus</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>S. gordonii</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>S. intermedius</i>	3.65	3.97	0.00	0.00
<i>S. mitis</i>	0.59	0.00	10.03	14.71
<i>S. oralis</i>	3.14	0.00	0.00	1.54
<i>S. sanguinis</i>	8.17	2.56	0.00	8.05
<i>A. odontolyticus</i>	19.46	2.62	12.94	2.43
<i>V. parvula</i>	17.50	11.88	0.00	12.83
<i>C. gingivalis</i>	3.33	0.00	0.00	0.00
<i>C. ochracea</i>	0.00	0.00	0.00	2.18
<i>C. sputigena</i>	0.00	0.00	0.00	0.15
<i>E. corrodens</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>C. gracilis</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>C. rectus</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>C. showae</i>	0.00	0.00	0.00	4.39
<i>E. nodatum</i>	0.00	2.72	2.00	11.53
<i>F. nucleatum</i>	1.18	22.35	20.48	2.83
<i>F. periodonticum</i>	0.00	7.43	6.34	1.86
<i>P. micra</i>	0.00	0.79	1.28	1.64
<i>P. intermedia</i>	0.00	0.00	0.00	0.63
<i>P. nigrescens</i>	0.00	5.75	3.76	1.29
<i>S. constellatus</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>P. gingivalis</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>T. forsythia</i>	0.00	0.00	1.34	0.00
<i>T. denticola</i>	1.28	0.00	0.00	0.00
<i>A. a. b</i>	12.86	0.00	0.97	0.00
<i>S. noxia</i>	1.52	1.82	6.01	0.00
<i>C. matruchioi</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>E. saburreum</i>	0.00	0.87	2.06	0.00
<i>F. alocis</i>	0.00	2.99	0.00	0.00
<i>P. endodontalis</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>N. mucosa</i>	0.00	0.00	1.08	0.00
<i>G. morbillorum</i>	0.00	0.00	7.88	0.00
<i>P. loeschii</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>P. melaninog.</i>	0.00	2.90	0.00	0.00
<i>P. acnes</i>	0.00	18.31	15.02	6.66
1	29.03	18.83	0.00	38.47
2	4.61	0.87	2.06	6.57
3	19.46	10.05	19.28	4.29
4	0.00	0.00	9.23	0.00
5	12.99	56.64	41.34	21.10
6	28.66	5.21	7.09	13.32
7	1.52	1.82	6.01	0.00
8	3.72	6.58	14.99	16.25

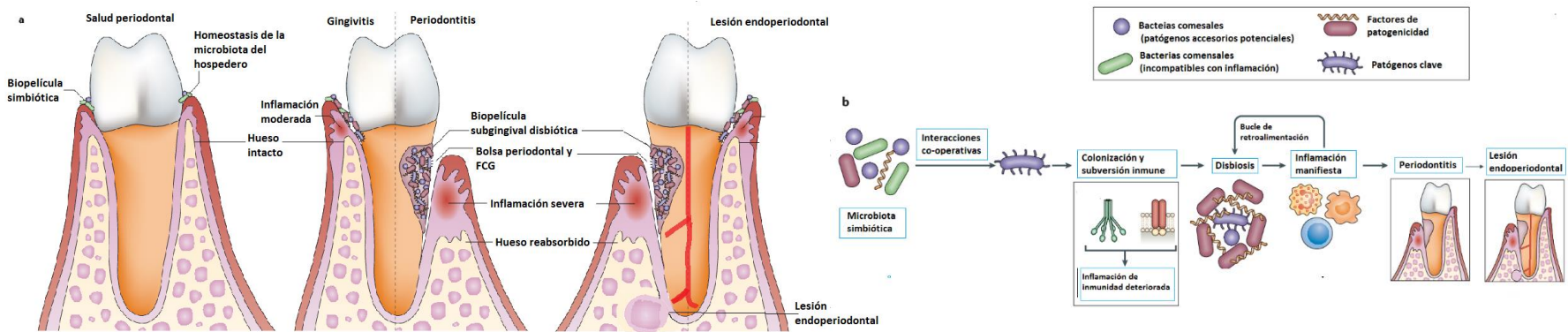
**A.a.b:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* stp. b. **1-8 Complejos bacterianos:** Las especies fueron agrupadas lo más similarmente posible a la descripción de complejos microbianos en la placa dentobacteriana subgingival<sup>8,9</sup>, representadas con un color de acuerdo con la **tabla 2**. T0: Tiempo 0, T1: 1 mes, T3: 3 meses y T12: 12 meses. **Marca naranja:** especies por debajo del 50% comparando T1, T3 y T12 contra T0

**Tabla 10.** Especies bacterianas subgingivales identificadas en sujetos con periodontitis bajo tratamiento con *L. reuteri*

AUTOR	AÑO	MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN	ESPECIES EVALUADAS	GRUPOS COMPARADOS	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS PERIODONTALES	CUENTAS/PREVALENCIA/PROPORCIÓN
Mayanagui, G.	2009	PCR tiempo real	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Treponema denticola</i> y <i>Tanarella forsythia</i>	8 semanas uso de <i>L. salivarius</i> WB21 + Xilitol	Nm	Prevalencia Disminución en la suma total de especies periodontopatogénicas. <i>T. forsythia</i> disminuyó significativamente después de las 4 y 8 semanas.
Sinkiweicz, G.	2010	Checkerboard DNA/DNA hibridación	<i>P.gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>P. endodontalis</i> , <i>T. forsythia</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>T. denticola</i> , <i>P. micra</i> , <i>C. rectus</i> , <i>S. intermedia</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>S. mutans</i> , <i>V. parvula</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>F. alocis</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. acidophilus</i> .	Prodentis VS Placebo 12 semanas de uso <i>L. reuteri</i> se compara placa subgingival y saliva	Aumento en el índice de placa ( $p=0.023$ )	Cuentas de <i>L. reuteri</i> se encontraron elevadas en el grupo control. Aumento significativo entre las especies buenas/malas. <i>A. naeslundii</i> tuvo el puntaje promedio más alto en ambos grupos.
Vivekananda, M.R	2010	Cultivo	<i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>P. gingivalis</i> ,	<i>L. reuteri</i> + R, R y AR + Placebo	IPLA, GI y GBI redujeron $p<0.001$ . La mayor reducción de IPLA se obtuvo con RyAR+prodentis(0.76±0.29)	Cuentas <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>P. intermedia</i> y <i>P. gingivalis</i> 1 log 10 unidad ( $p< 0.01$ ) en prodentis y en R y AR + prodentis
Inesta, M.	2012	Cultivo y PCR	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>P. micra</i> , <i>C. rectus</i> , <i>Capnocytophaga</i> spp., <i>Eikenella corrodens</i> , <i>Fusobacterium</i> spp.	Tableta probiótico vs Placebo	No se obtuvieron diferencias significativas entre grupos	Disminución de <i>P. gingivalis</i> entre el inicio y la 4a semana en el grupo de prueba ( $p=0.057$ ) y un aumento en el grupo control ( $p=0.069$ ) con una diferencia entre ambos de ( $p=0.008$ ). Reducción de <i>A. actinomycetemcomitans</i> en el grupo prueba después de 4 semanas ( $p=0.074$ ) y a la 8 semanas ( $p=0.049$ ) con clara diferencia intergrupal en el inicio y la 4 semanas ( $p=0.036$ ). Menor cuenta de <i>F. nucleatum</i> en el grupo prueba después de 4 semanas ( $p=0.073$ ) después de 8 semanas aumento en el conteo. Incremento ( $p=0.041$ ) en cuentas de <i>E. corrodens</i> en el grupo control desde el inicio hasta la 8 semana.
Vicario, M.	2013	Nm	Parámetros periodontales	1 mes uso de <i>L. reuteri</i> (sunstar GUM)	Disminución significativa $p<0.05$ en todos los parámetros clínicos (índice de placa, sangrado al sondeo y profundidad de bolsas)	Nm
Teughels, W.	2013	PCR	<i>T. forsythia</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>F. nucleatum</i> y <i>P. intermedia</i>	R y AR+ <i>L. reuteri</i> vs R y AR	NA	Reducción ( $p < 0.05$ ) en el número de <i>P. gingivalis</i> en R y AR+ probiótico a las semana 12 comparado con el grupo R y AR. Disminución de <i>P. gingivalis</i> en saliva a la semana 9 y 12 en R y AR ( $p0.085$ y $0.098$ ). <i>P. intermedia</i> mayor reducción y menor número en las muestras de la placa subgingival a la semana 12 de R y AR+ Probiótico ( $p0.074$ y $0.085$ )
Gizem, I.	2015	Elisa	Parámetros periodontales y parámetros bioquímicos MMP8	3 semanas seguimiento de 1 año <i>L. reuteri</i> + R y AR, R y AR+ placebo	Disminución de PI, GI, BOP y PD $p<0.05$ en pacientes usando prodentist y R y AR. El índice de inserción fue significativamente más alto comparado con el grupo control	Nm

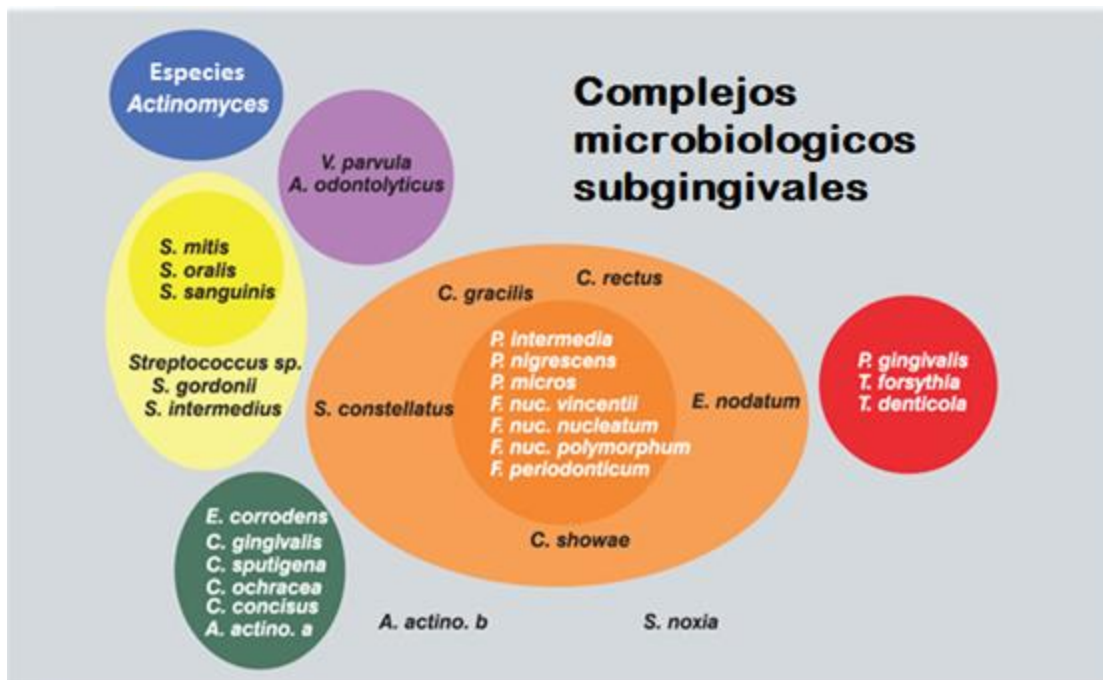
PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa. Nm: No se menciona. SRP+P: Raspado y alisado radicular+ Probiótico. SRP: Raspado y alisado radicular + Placebo.

# FIGURAS



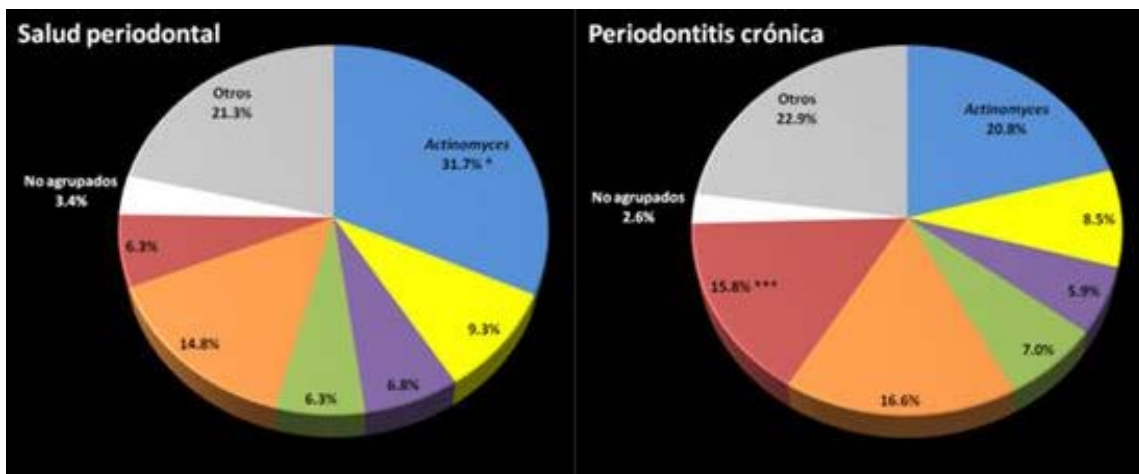
Salud periodontal, enfermedad y condiciones gingivales Chapple, Mealey, et al 2018 Consensus Rept Trombelli et al 2018 Definición de caso			Periodontitis Papapanou, Sanz et al 2018 Consensus Rept Japsen, Caton et al 2018 Consensus Rept Tonetti, Greenwell, Kornman. 2018 Definición de caso			Otras condiciones que afectan el periodonto Papapanou, Sanz et al 2018 Consensus Rept Japsen, Caton et al 2018 Consensus Rept				
Salud periodontal y salud gingival	Gingivitis: Inducida por biopelícula dental	Enfermedad gingival: No inducida por biopelícula dental	Enfermedad Periodontitis necrozante	Periodontitis <sup>1</sup>	Periodontitis como manifestación de enfermedades sistemicas	Enfermedades sistemicas o condiciones que afectan el tejido de soporte	Abscesos periodontales y lesiones endoperiodontal <sup>2</sup>	Deformidades y condiciones mucoginivales	Fuerzas oclusales traumaticas	Factores relacionados a dientes y protesis <sup>3</sup>

**Figura 1.** Enfermedad periodontal, en la cual se desarrolla la gingivitis y es seguida de la periodontitis, a causa de la disbiosis de la biopelícula, que a su vez estimula al sistema inmunológico y persistiendo un estado inflamatorio (Modificado de Hajishengallis 2015 <sup>4</sup>). Clasificación actual de las enfermedades periodontales modificado de Caton 2018 <sup>6</sup> <sup>1</sup>. 1y 2 lesiones que comparten disbiosis de biopelícula subgingival y 3 es un factor de riesgo ambiental modificable en enfermedades periodontales.



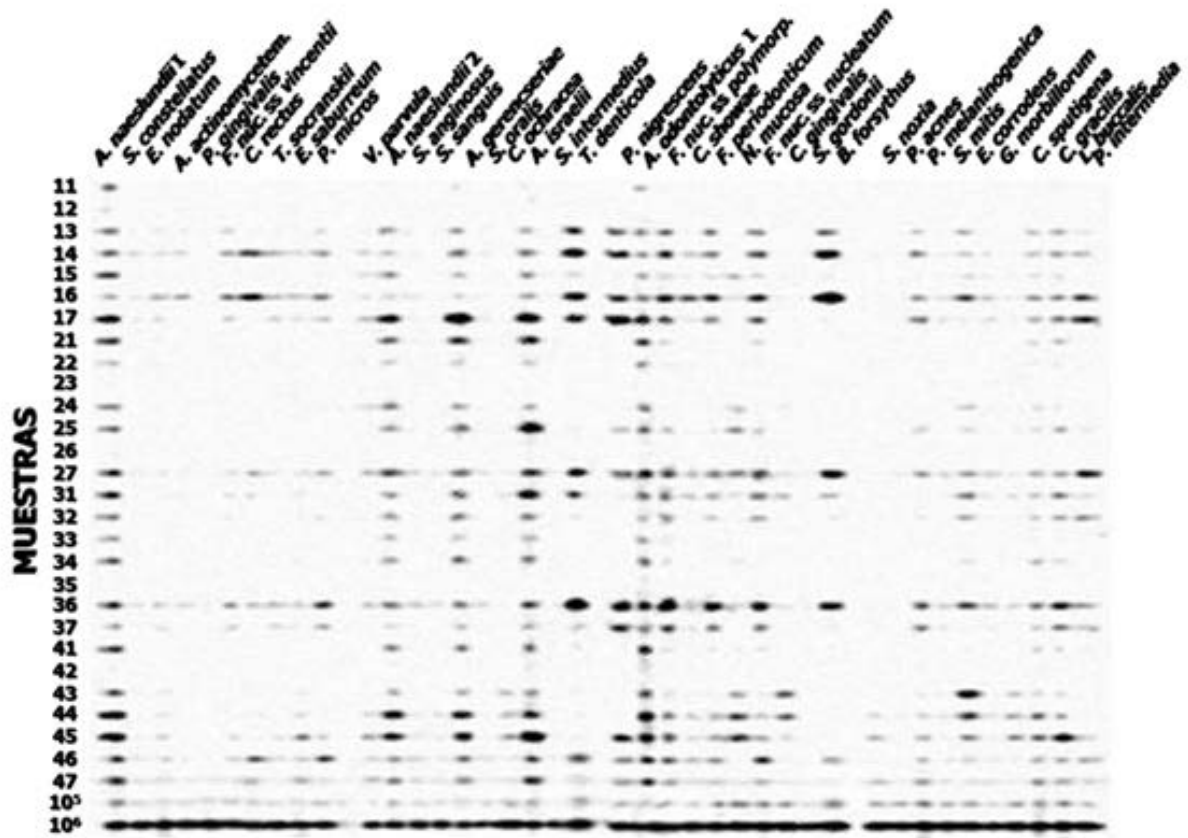
**Figura 2.** Diagrama representativo de las asaciones entre especies bacterianas de la placa subgingival, agrupadas por complejos microbianos. Los complejos de *Actinomyces*, morado, amarillo y verde son especies consideradas como “colonizadoras primarias” o especies asociadas a salud periodontal. El complejo naranja se compone principalmente de especies “colonizadoras puente” periodontopatógenas putativas, y el complejo rojo se compone por especies “colonizadoras tardías” patógenas reconocidas, modificado de Socransky <sup>9</sup>.





**Figura 3.** Imagen de la proporción por complejos bacterianos de sujetos mexicanos en condiciones de salud periodontal y con periodontitis crónica generalizada en la población mexicana. Las especies del complejo de *Actinomyces* y del complejo “otros” son especies se encuentran en mayor proporción en salud periodontal comparado con periodontitis. Por otro lado, en periodontitis se encuentran en mayor proporción especies del complejo rojo, comparado con salud periodontal<sup>11</sup>.

## Hibridación DNA-DNA



**Figura 4.** Imagen representativa de una membrana de nylon en la que se procesaron microbiológicamente 28 muestras de placa dentobacteriana para la identificación y enumeración de 40 especies bacterianas mediante la técnica de Checkerboard para hibridaciones DNA-DNA. Con esta técnica es posible obtener cerca de 1,120 identificaciones bacteriológicas en un sólo ensayo mediante señales positivas quimio luminiscentes en placas radiográficas.

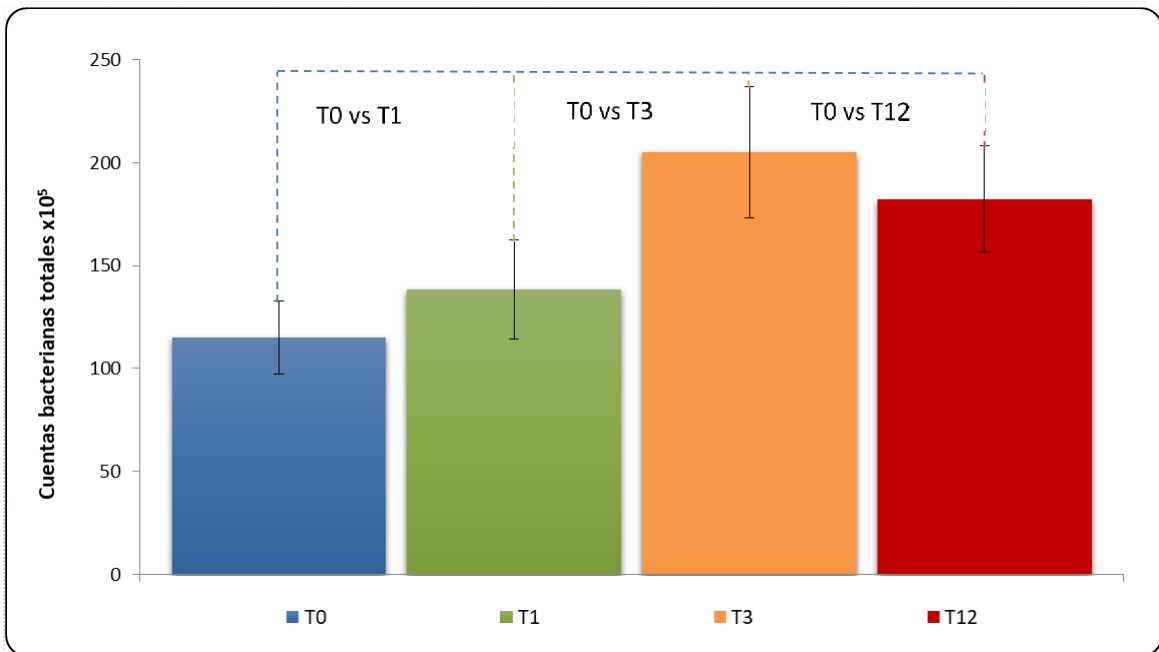


**Figura 5a.** Fotografías clínicas oclusal, vestibular y laterales izquierda y derecha del sujeto de estudio en tiempo 0 (T0)

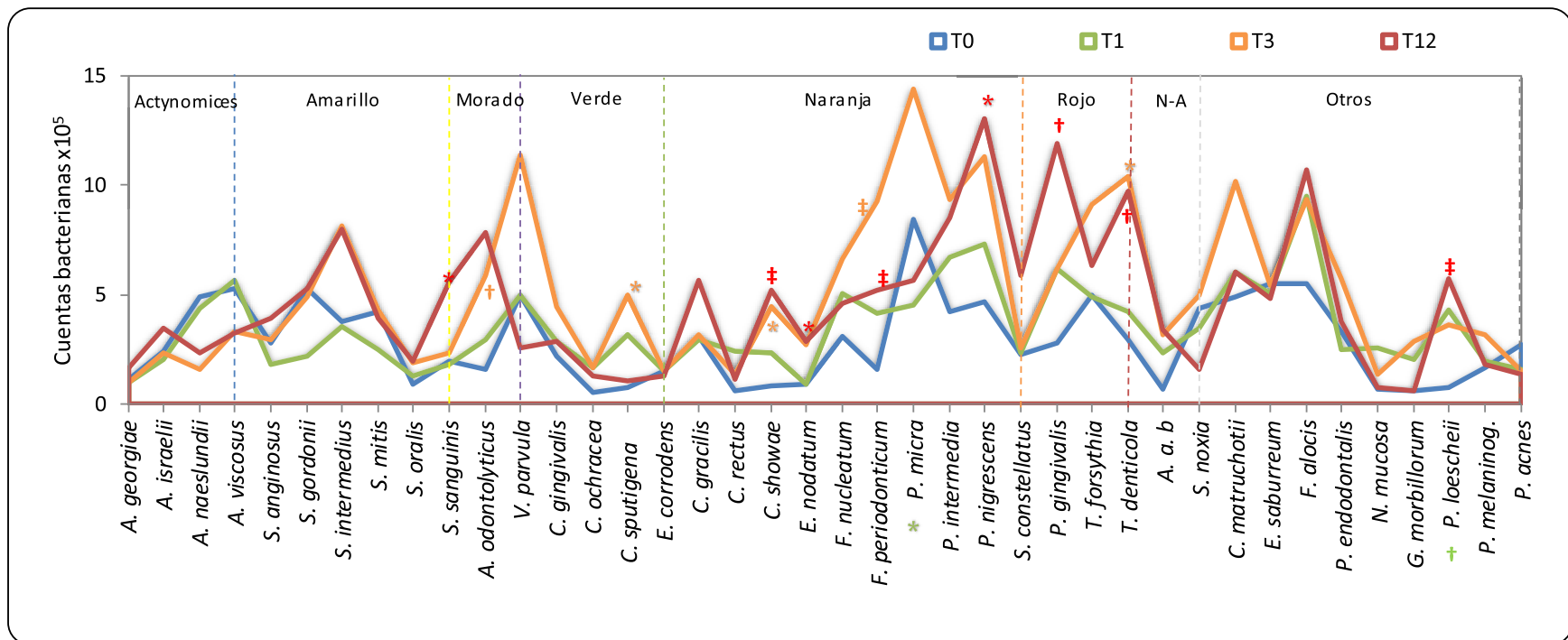


**Figura 5. A.** Fotografías clínicas oclusal, vestibular y laterales izquierda y derecha del sujeto de estudio en tiempo 1 (T1) durante el tratamiento del probiótico coadyuvante.

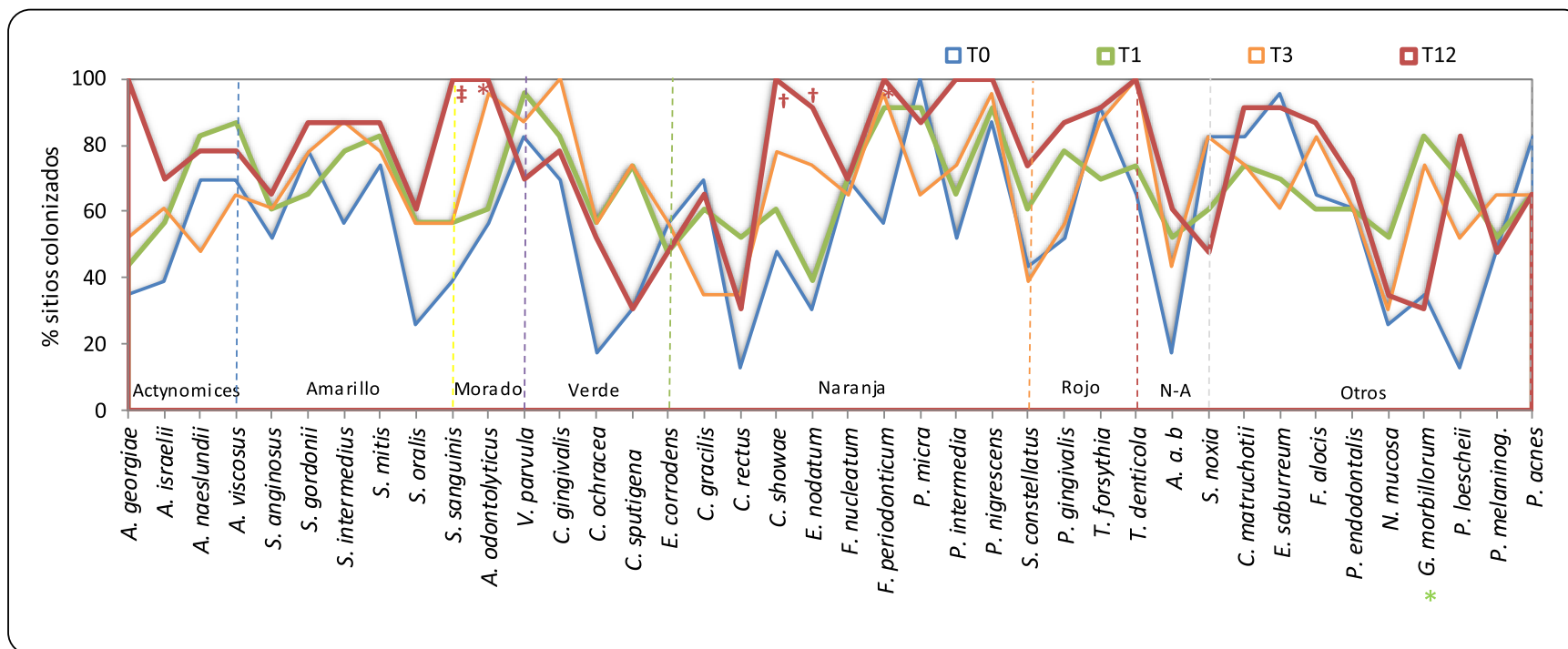
Tiempo	T0		1 mes		3 meses		12 meses	
Cuentas totales x10 <sup>5</sup>	Media	± EEM	Media	± EEM	Media	± EEM	Media	± EEM
	115.12	17.74	138.48	23.93	204.87	31.91	182.42	25.65



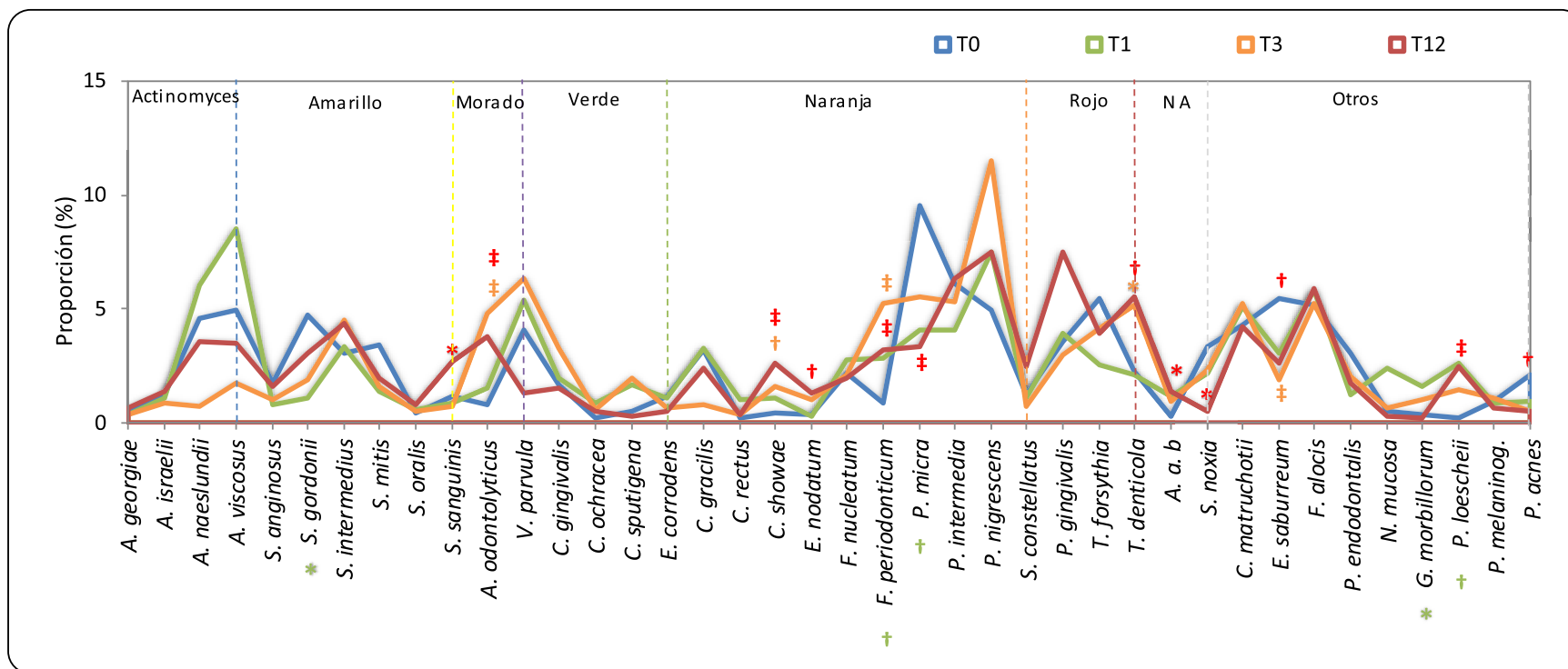
**Figura 6.** Niveles totales promedio (cuentas bacterianas totales x 10<sup>5</sup> ± EEM) de las 40 especies bacterianas evaluadas en muestras de placa dentobacteriana subgingival del sujeto de estudio. Los niveles totales fueron calculados determinando los niveles para cada especie en cada muestra de placa, promediados entre las 23 muestras de los diferentes tiempos, obteniendo posteriormente la sumatoria del promedio de cuentas de todas las especies evaluadas y finalmente el promedio de la sumatoria entre los tiempos del estudio. Las diferencias entre cada tiempo no fueron estadísticamente significativas después de ajustar para comparaciones múltiples (prueba U de Mann-Whitney). Las significancias de los diferentes tiempos se presentan en la **Tabla 6a**.



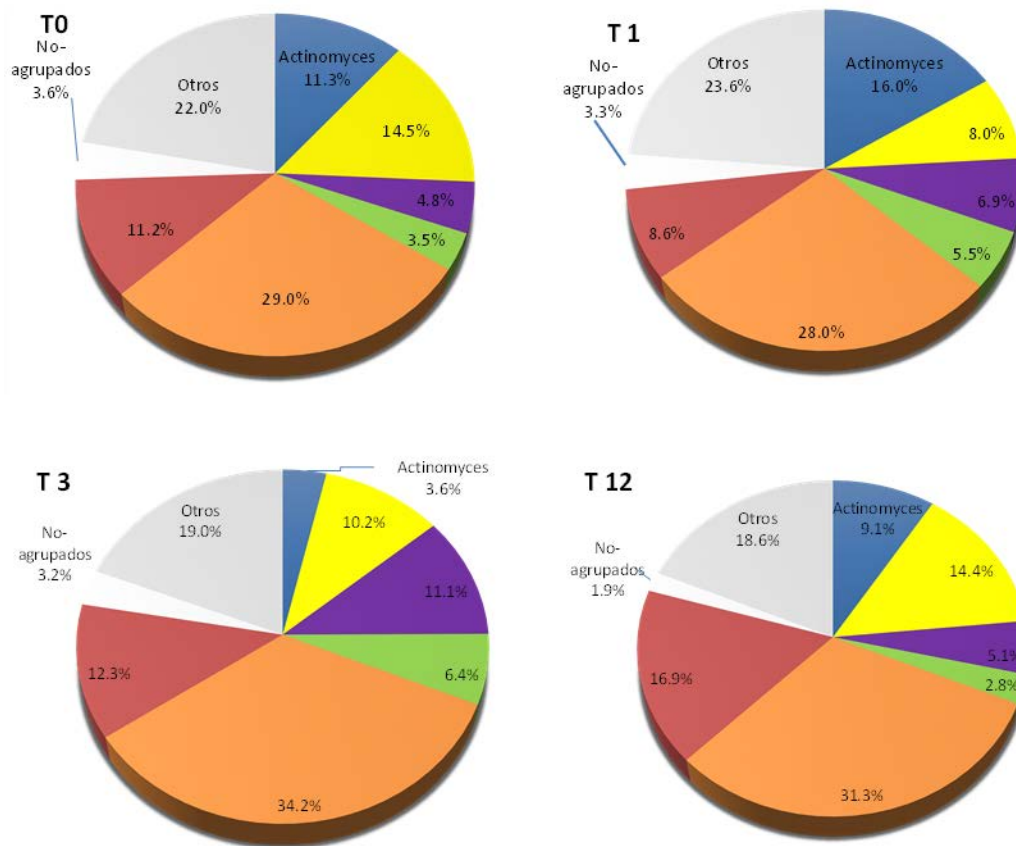
**Figura 7a.** Niveles promedio (cuentas bacterianas x 10<sup>5</sup> ± EEM) de las 40 especies individuales en muestras de placa dentobacteriana subgingival (N=92) del sujeto de estudio en distintos tiempos del estudio longitudinal de probiótico *L. reuteri* (T0= Tiempo cero (n=23); T1= T1 mes (n=23); T3= 3 meses (n=23) y; T12=12 meses (n=23)). Los niveles totales fueron calculados determinando los niveles para cada especie en cada muestra de placa, promediados entre las 23 muestras del sujeto de estudio y posteriormente entre los diferentes tiempos del estudio longitudinal. La significancia de las diferencias entre los tiempos se presenta en la **tabla 6a**. Prueba de Kruskal Wallis Kruskal: \*p<0.05, † p<0.01 y ‡ p<0.001 y prueba U de Mann Whitney para comparaciones pareadas referenciada en **tabla 6b**, con ajuste de comparaciones múltiples.



**Figura 8a.** Prevalencia promedio (% sitios colonizados  $\pm$  EEM) de las 40 especies individuales en muestras de placa dentobacteriana subgingival (N=92) del sujeto de estudio. La prevalencia promedio fue calculada para cada especie en cada muestra de placa, en distintos tiempos del estudio longitudinal de probiótico *L. reuteri* (T0= Tiempo cero (n=23); T1= T1 mes (n=23); T3= 3 meses (n=23) y; T12=12 meses (n=23)). Los niveles totales fueron calculados determinando los niveles para cada especie en cada muestra de placa, promediados entre las 23 muestras del sujeto de estudio y posteriormente entre los diferentes tiempos del estudio longitudinal. La significancia de las diferencias entre los tiempos se presenta en la **tabla 7a** Prueba de Kruskal Wallis: \*  $p < 0.05$ , †  $p < 0.01$  y ‡  $p < 0.001$  y prueba U de Mann Whitney para comparaciones pareadas referenciada en **tabla 7b**, con ajuste de comparaciones múltiples.



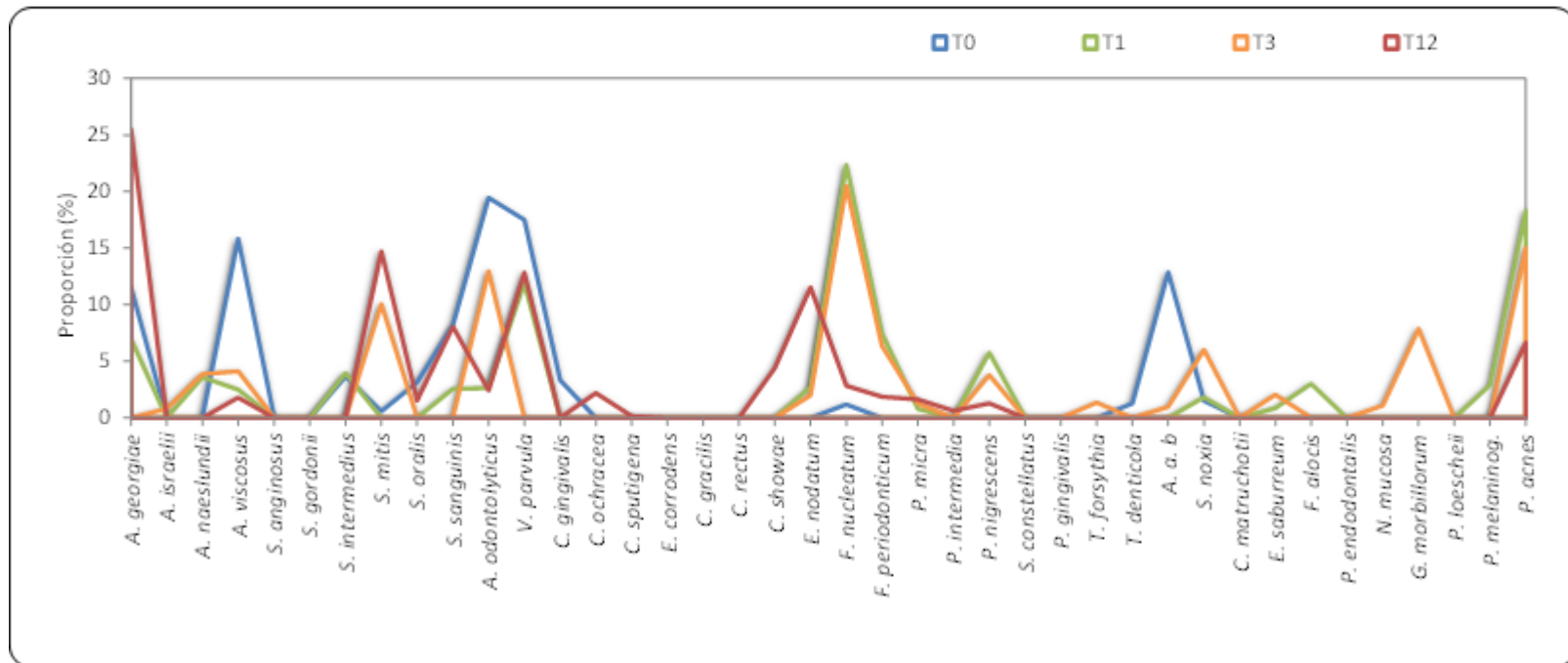
**Figura 9b.** Proporción promedio (% de cuentas bacterianas totales  $\pm$  EEM) de las 40 especies individuales en muestras de placa dentobacteriana subgingival (N=92) del sujeto de estudio en distintos tiempos del estudio longitudinal de probiótico *L. reuteri* (T0= Tiempo cero (n=23); T1= T1 mes (n=23); T3= 3 meses (n=23) y; T12=12 meses (n=23)). Las proporciones totales fueron calculadas determinando los niveles para cada especie en cada muestra de placa, promediados entre las 23 muestras del sujeto de estudio y posteriormente entre los diferentes tiempos del estudio longitudinal. La significancia de las diferencias entre los tiempos se presenta en la **tabla 8a**. Prueba de Kruskal Wallis: NS=No significativo, \*  $p < 0.05$ , †  $p < 0.01$  y ‡  $p < 0.001$  y prueba U de Mann Whitney para comparaciones pareadas referenciada en **tabla 8b**, con ajuste de comparaciones múltiples.



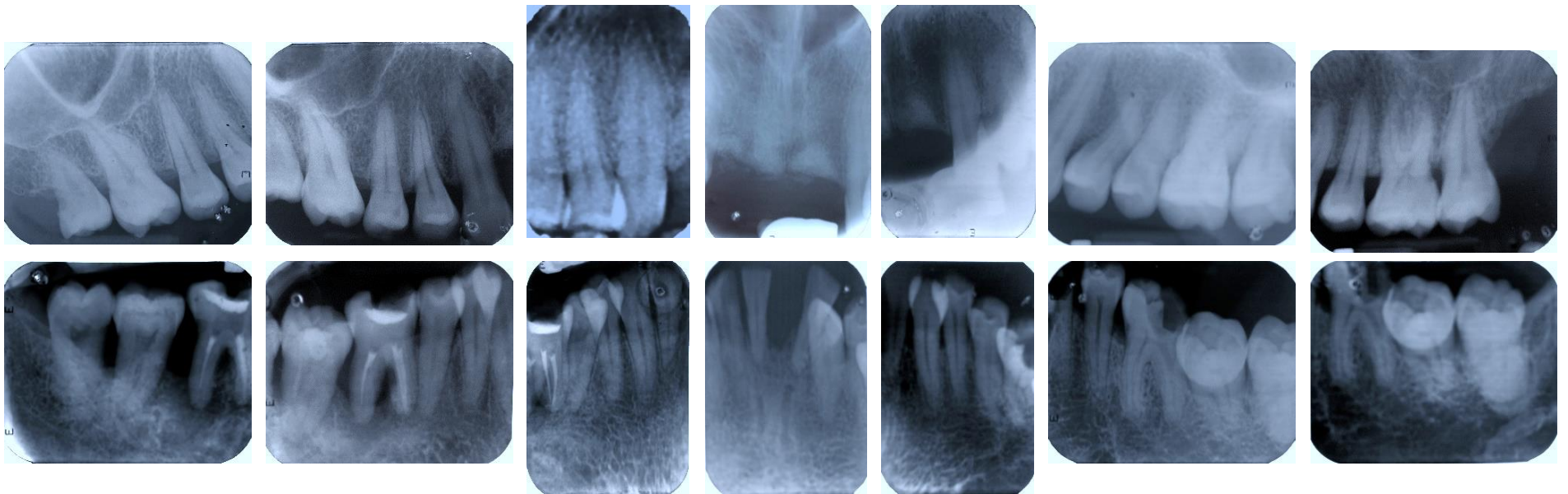
**Figura 10.** Proporciones promedio (% de cuentas bacterianas totales  $\pm$  EEM) de complejos bacterianos en muestras de placa dentobacteriana subgingival de 1 sujeto de estudio (PC). Las 40 especies evaluadas fueron agrupadas en 8 complejos de acuerdo con la descripción de complejos bacterianos en la placa subgingival<sup>8,9</sup> (las excepciones se describen en la **Tabla 2.**) Las proporciones fueron calculadas para cada complejo bacteriano en cada muestra de placa, promediadas entre las 23 muestras del sujeto de estudio y posteriormente entre los diferentes tiempos. Prueba de U de Mann-Whitney: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$  **Tabla 8a y 8 b.**



Tiempo	T0	1 mes	3 meses	12 meses
Cuentas totales x10 <sup>5</sup>	Media 55.03	Media 66.68	Media 63.34	Media 20.12



**Figura 11.** Niveles totales del diente 46(cuentas bacterianas totales x 10<sup>5</sup> ± EEM) de las 40 especies bacterianas promediadas (tabla 2). Los niveles totales fueron calculados determinando los niveles para cada especie en la muestra de placa de los diferentes tiempos. Gráfica con Proporciones promedio de las 40 especies individuales, en muestra de placa dentobacteriana subgingival del diente 46. Al ser un dato microbiológico por especie bacteriana, no es posible realizar pruebas estadísticas de comparación múltiple entre los tiempos evaluado



**Figura 12.** Serie radiográfica periapicales de paciente de estudio. De acuerdo con la actual clasificación de las enfermedades periodontales y periapicales<sup>1</sup>, se determinó que presentaba periodontitis generalizada, estadio IV y grado B.

## ANEXOS

### ANEXO 1. CONSTANCIA DE PARTICIPACIÓN EN LA INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR DENTAL RESEARCH, DIVISIÓN MEXICANA



## ANEXO 2. FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

(Hoja 1 de 3)

Laboratorio de Genética Molecular  
Facultad de Odontología  
Universidad Nacional Autónoma de México



FE-GMLIFO-001 (5)  
SECCIÓN ISO-4.2

**CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PERIODONCIA  
(FOLIO NO. 001)**

**INVESTIGADOR RESPONSABLE:** Dra. Laurie Ann Ximénez-Fyvie.

**CLÍNICOS RESPONSABLES:**

- Mtra. Adriana-Patricia Rodríguez-Hernández.
- Esp. Velia Jacobo-Soto.
- Dra. Gaby Esthela-Tiznado.
- Mtra. Ma. de Lourdes Márquez-Corona.

**INSTITUCIÓN:** Laboratorio de Genética Molecular.  
División de Estudios de Posgrado e Investigación.  
Facultad de Odontología, UNAM.

**TELÉFONO:** (044) 55-2699-7530 (horas y días hábiles)

**E-MAIL:** [contacto@labgenmol.onmicrosoft.com](mailto:contacto@labgenmol.onmicrosoft.com)

**TÍTULO DEL PROYECTO:** Factores microbiológicos y genéticos relacionados con las enfermedades periodontales en México (DGAPA # IN213006-3).

**INVITACIÓN A PARTICIPAR:** Usted está invitado a participar en un estudio de investigación que analiza las bacterias de la boca así como las características genéticas y del sistema de defensa de las personas que padecen enfermedades de las encías.


**PROPÓSITO:** Usted debe entender que los objetivos del estudio son determinar la presencia y cantidad de bacterias que se encuentran en la boca de personas con diferentes tipos de enfermedades de las encías y comparar las características genéticas y la magnitud de la respuesta del sistema de defensa entre personas con y sin enfermedades de las encías.

**PROCEDIMIENTOS:** Usted debe entender que para participar en el estudio debe haber nacido en la República Mexicana, no debe padecer ninguna enfermedad sistémica a excepción de diabetes, debe tener por lo menos 20 dientes naturales en la boca, no puede haber recibido ningún tipo de tratamiento periodontal en el pasado, no puede haber recibido una limpieza dental profesional en el último mes y no puede haber tomado ningún tipo de antibiótico en los últimos 3 meses. Asimismo, en el caso de ser mujer, no puede estar embarazada ni lactando.

Usted debe entender que su participación en este estudio de investigación requiere uno o más de los siguientes procedimientos:

- **La realización de una evaluación periodontal completa**, la cual consistirá en medir la profundidad de las pequeñas "bolsas" que se encuentran entre sus dientes y sus encías. Estas medidas serán tomadas con un instrumento especial llamado sonda que será introducido en dichas "bolsas" en 6 lugares diferentes alrededor de cada diente de su boca. Este es un procedimiento de rutina ampliamente utilizado en la práctica dental. Además de lo anterior, se le realizará una evaluación general de la salud de sus encías para saber si sangran, si están inflamadas, si están enrojecidas, etc.

**COPIA ARCHIVO**



ISO 9001:2008  
COPANT/ISO 9001-2008  
NMX-CC-9001-IMNC-2008

**MJVO**  
Iniciales del paciente

Circuito Institutos  
Ct. Universitaria  
México D.F. 04510

FE-GMLIFO-005



CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PERIODONCIA  
(FOLIO NO. 001)

FE-GMLIFO-001 (5)  
SECCIÓN ISO: 4.2

- **La obtención de algunos de sus datos generales y médicos**, lo cual consistirá en el llenado de una historia clínica con preguntas que le serán leídas por el clínico que lo atienda y la medición de su peso, estatura, presión sanguínea, pulso y porcentaje de grasa corporal.
- **La toma de un máximo de 28 muestras de placa dentobacteriana**, lo cual se realizará tomando con un instrumento dental, una muestra de la película blanquecina que se forma naturalmente sobre la superficie de sus dientes (placa dentobacteriana) de todos los dientes de su boca. Este procedimiento no es doloroso aunque en algunas ocasiones puede ser un poco molesto. Cada muestra de placa dentobacteriana será colocada dentro de un tubo.
- **La toma de 1 muestra de máximo 11 ml de sangre**, lo cual se realizará siguiendo los mismos procedimientos que se llevan a cabo en laboratorios de diagnóstico clínico acreditados. Dicho procedimiento consiste en colocar una liga gruesa ligeramente apretada alrededor de su brazo para facilitar la visualización de sus venas. Posteriormente, se introduce una aguja a una vena de alguno de sus brazos y se deposita la sangre en uno o dos tubos de vidrio conforme sale de la vena. La liga y aguja serán retiradas y el sitio de punción será cubierto con un curita una vez que el clínico determine que ha dejado de sangrar. Este procedimiento puede causarle dolor o molestias principalmente en el sitio de la punción.
- **La toma de 1 muestra de células epiteliales de la mucosa bucal**, lo cual se realizará frotando un algodón sobre la superficie interna de sus mejillas, paladar, labios, encías y por debajo de la lengua durante aproximadamente 1 minuto. Este procedimiento no conlleva ninguna molestia. La muestra será colocada sobre una tarjeta de papel especial.

Usted debe entender que todos los procedimientos serán realizados en una sola visita que tendrá una duración máxima de 2 horas y que en este estudio participarán aproximadamente 500 (quinientas) personas.

Usted debe entender que su participación en el estudio no implica que será sometido a ningún tratamiento diferente o adicional a aquellos tratamientos que su clínico tratante considere necesarios para su caso.

**RIESGOS:** Usted debe entender que los riesgos que usted corre con su participación en este estudio son mínimos. La evaluación periodontal que se le realizará es la misma que realiza cualquier dentista para determinar la salud de sus encías. Las muestras de placa se tomarán siguiendo procedimientos similares a los que se realizan durante una limpieza dental. La muestra de células epiteliales de la mucosa bucal no conlleva ninguna molestia; y la muestra de sangre puede causarle algunas molestias menores pero no duraderas en el sitio de la punción.

Debe entender que todos los procedimientos serán realizados por profesionales calificados y con experiencia, utilizando procedimientos de seguridad aceptados para la práctica clínica. Todo el personal que le atenderá utilizará guantes desechables, bata y cubrebocas para su propia protección y la de usted. Todos los materiales e instrumental que serán utilizados serán desechables y/o estarán esterilizados para su protección.

**BENEFICIOS:** Usted debe entender que su participación no le proporcionará ningún beneficio inmediato ni directo. Sin embargo, gracias a su participación, se obtendrá información nueva y más extensa sobre las causas y los factores que intervienen en las enfermedades de las encías en la población de México, lo cual podría ayudar en un futuro no sólo al mejor entendimiento de dichas enfermedades, sino también a la búsqueda y empleo de nuevos tratamientos para nuestra población.

COPIA ARCHIVO



ISO 9001:2008  
COPANT/ISO 9001:2008  
NMX-CC-9001-IMNC-2008

MUJO  
Iniciales del paciente

Circuito Institutos  
Cd. Universitaria  
México D.F. 04510

FE-GMLIFO-005

Laboratorio de Genética Molecular  
Facultad de Odontología  
Universidad Nacional Autónoma de México



CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PERIODONCIA  
(FOLIO NO. 001)

FE-GMLIFO-001 (5)  
SECCIÓN ISO: 4.2

**COMPENSACIONES:** Usted debe entender que no existe ninguna compensación monetaria por su participación pero que tampoco incurrirá en ningún gasto adicional.

**CONFIDENCIALIDAD:** Usted debe entender que toda la información que sea obtenida tanto en sus historiales clínicos como en el análisis de sus muestras será mantenida en estricta confidencialidad. Así mismo, si cualquier publicación resultara de esta investigación, no se le identificará jamás por nombre.

**RENUNCIA/RETIRO:** Usted debe saber que su participación en el estudio es totalmente voluntaria y que puede decidir no participar o retirarse del estudio en cualquier momento, sin que esto represente algún perjuicio para su atención dental presente ni futura en las clínicas de la Facultad de Odontología de la UNAM. También debe entender que si cualquiera de los responsables de este estudio decidieran no incluirle en la investigación, pueden hacerlo si así lo creyeran conveniente.

**DERECHOS:** Usted tiene el derecho de hacer preguntas y de que éstas le sean contestadas a su plena satisfacción. Puede hacer sus preguntas en este momento, antes de firmar la presente forma o en cualquier momento en el futuro. Si desea mayores informes acerca de su participación en este estudio de investigación o sobre sus derechos como sujeto de estudio, puede contactar a cualquiera de los responsables llamando al número de teléfono que se encuentra en la parte superior de la primera página de esta forma.

**ACUERDO:** Al firmar en los espacios provistos a continuación usted constata que ha leído y entendido esta forma de consentimiento y que está de acuerdo con su participación en este estudio. Al terminar la visita recibirá una copia de esta forma.

 Nombre del Paciente	 Firma del Paciente	13/ENERO 2016 Fecha (Día/mes/año)
José Isaac Maldonado Vazquez Nombre del Clínico Responsable	 Firma del Clínico Responsable	13/Enero/2016 Fecha (Día/mes/año)

MUVO  
Iniciales del paciente

COPIA ARCHIVO



ISO 9001:2008  
COPANT/ISO 9001:2008  
NMX-CC-9001-IMNC-2008

Circuito Instituto  
Cd. Universitaria  
México D.F. 04510

FE-GMLIFO-005

# ANEXO 3. REPORTE DE RESULTADOS DE CURSO DE CALIBRACIÓN DE CLÍNICOS

(Hoja 1 de 4)

Laboratorio de Genética Molecular  
 Facultad de Odontología  
 Universidad Nacional Autónoma de México



## REPORTE DE RESULTADOS CURSO DE CALIBRACIÓN DE CLÍNICOS

FE-GMLIFO-004 (2)  
 SECCIÓN ISO- 4.2

### Información del participante

Clave	C13
Nombre	José Isaac Maldonado Noriega
Participó como	Clínico (Especialista)
Tipo de participación	Teórica y práctica
R.F.C.	
Institución o empresa	Centro De Estudios Superiores De Ortodoncia A.C.
Calle y no.	Nicolás San Juan 1628
Colonia	Del Valle centro
Delegación	
Ciudad	México
Estado	Distrito Federal
País	México
Código postal	03100
Teléfono	
Fax	
Móvil	(55)1387-2794
E-mail	drisaac.maldonado@gmail.com
Web	
Sesión teórica	02 de octubre de 2014 de 12:00 a 16:00 hrs.
Sesión práctica	26 de septiembre de 2014 de 10:00 a 14:00 hrs. <b>(No. 6)</b>
Participaciones previas	1 (una): CCP-001-2013_C13 (2 de febrero de 2013).

El presente documento está firmado electrónicamente. Este reporte se emitió a petición del participante como parte de un servicio contratado para los fines que a él mismo convengan. El Laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Odontología de la UNAM y sus integrantes, se deslindan de cualquier responsabilidad relacionada con el uso o divulgación de la información proporcionada, la cual no constituye un conflicto de interés alguno ya que las partes no sostienen vínculos científicos, laborales o económicos que pudieran interpretarse como tal.



Círculo Institutos  
 Cd. Universitaria  
 México D.F. 04510

FE-GMLIFO-005

(Hoja e de 4)

Laboratorio de Genética Molecular  
Facultad de Odontología  
Universidad Nacional Autónoma de México



REPORTE DE RESULTADOS  
CURSO DE CALIBRACIÓN DE CLÍNICOS

FE-GMLIFO-004 (2)  
SECCIÓN ISO: 4.2

**Información del curso**

Clave	CCP-2014-JIMN_C13
Fecha	Del 04 de agosto al 02 de octubre de 2014.
Sesiones teóricas (ST)	2 (dos)
Fecha ST	04 de agosto de 2014 de 9:00 a 13hrs. y de 15:00 a 18:00 y 02 de octubre de 2014 de 12:00 a 16:00 hrs.
Participantes ST	26
Valor curricular ST	4 (cuatro) horas
Responsable de ST	Dra. Laurie Ann Ximénez Fyvie
Sesiones prácticas (SP)	7 (siete)
Fecha SP	22 de septiembre de 2014 de 10:00 a 14:00 hrs. <b>(No. 1)</b> 23 de septiembre de 2014 de 10:00 a 14:00 hrs. <b>(No. 2)</b> 23 de septiembre de 2014 de 16:00 a 20:00 hrs. <b>(No. 3)</b> 24 de septiembre de 2014 de 10:00 a 14:00 hrs. <b>(No. 4)</b> 24 de septiembre de 2014 de 16:00 a 20:00 hrs. <b>(No. 5)</b> 26 de septiembre de 2014 de 10:00 a 14:00 hrs. <b>(No. 6)</b> 02 de octubre de 2014 de 16:00 a 20:00 hrs. <b>(No. 7)</b>
Clínicos participantes SP	1 (uno) <b>(No. 1)</b> 3 (tres) <b>(No. 2)</b> 2 (dos) <b>(No. 3)</b> 2 (dos) <b>(No. 4)</b> 2 (dos) <b>(No. 5)</b> 2 (dos) <b>(No. 6)</b> 6 (seis) <b>(No. 7)</b>
Asistentes participantes SP	1 (uno) <b>(No. 1)</b> 1 (uno) <b>(No. 2)</b> 2 (dos) <b>(No. 3)</b> 2 (dos) <b>(No. 4)</b> 2 (dos) <b>(No. 5)</b> 0 (cero) <b>(No. 6)</b> 0 (cero) <b>(No. 7)</b>
Valor curricular SP	4 (cuatro) horas
Responsable de SP	Mtra. Adriana Patricia Rodríguez Hernández



ISO 9001:2008  
COPANT/ISO 9001:2008  
NNDX-CC-9001-4MNC-2008

Círculo Institutos  
Cd. Universitaria  
México D.F. 04510

FE-GMLIFO-005





REPORTE DE RESULTADOS  
CURSO DE CALIBRACIÓN DE CLÍNICOS

FE-GMLIFO-004 (2)  
SECCIÓN ISO: 4.2

**Resultados**

EVALUACIÓN DE LA SESIÓN TEÓRICA	
Calificación	<b>80% (Aprobado)*</b>
* Consulte la tabla de interpretaciones. <b>NP</b> : No presentó.	
EVALUACIÓN DE LA SESIÓN PRÁCTICA	
Paciente no. 1	
Clave	P31
Condición	Salud periodontal
Asistente	A23
Sitios evaluados	78
PB promedio (mm)	2.04 ± 0.11 (media ± EEM)
NI promedio (mm)	1.20 ± 0.05 (media ± EEM)
Medidas con variabilidad	PB = 30.8%, m(NI) = 48.7%
Variabilidad baja	PB = 91.7%, m(NI) = 92.1%
Variabilidad alta	PB = 8.3%, m(NI) = 7.9%
<b>Variabilidad promedio</b>	<b>PB = 0.17, NI = 0.27</b>
<b>Reproducibilidad promedio</b>	<b>PB = 83.2%, NI = 73.5%</b>
Paciente no. 2	
Clave	P32
Condición	Salud periodontal
Asistente	A30
Sitios evaluados	84
PB promedio (mm)	1.69 ± 0.05 (media ± EEM)
NI promedio (mm)	0.58 ± 0.05 (media ± EEM)
Medidas con variabilidad	PB = 31.0%, m(NI) = 52.4%
Variabilidad baja	PB = 92.3%, m(NI) = 86.4%
Variabilidad alta	PB = 7.7%, m(NI) = 13.6%
<b>Variabilidad promedio</b>	<b>PB = 0.17, NI = 0.30</b>
<b>Reproducibilidad promedio</b>	<b>PB = 83.2%, NI = 69.9%</b>

**PB**: profundidad de bolsa. **NI**: nivel de inserción. **mm**: milímetros. **EEM**: error estándar de la media. **Variabilidad baja**: 1 mm. **Variabilidad alta**: ≥2 mm. **m(NI)**: medida para calcular el NI.



ISO 9001:2008  
COPANT/ISO 9001-2008  
NMX-CC-9001-4MNC-2008

Círculo Institutos  
Cá. Universitaria  
México D.F. 04510

FE-GMLIFO-005



REPORTE DE RESULTADOS  
CURSO DE CALIBRACIÓN DE CLÍNICOS

FE-GMLIFO-004 (2)  
SECCIÓN ISO: 4.2

CALIFICACIÓN (SESIÓN PRÁCTICA)	
Variabilidad promedio	0.23 (Aceptable)*
Reproducibilidad promedio	77.4% (Aceptable)*

\*Consulte la tabla de interpretaciones.

INTERPRETACIONES	
<b>Sesión teórica</b>	
Calificación	≥75% - Aprobado ≤74% - No-Aprobado
<b>Sesión práctica</b>	
Medidas con variabilidad baja	≥90.0% - Excelente 89.9% a 71.0% - Aceptable ≤70.9% - No-aceptable
Medidas con variabilidad alta	≤10.9% - Excelente 11.0% a 29.9% - Aceptable ≥30.0% - No-aceptable
Variabilidad promedio	≤0.10 - Excelente 0.11 a 0.29 - Aceptable ≥0.30 - No-aceptable
Reproducibilidad promedio	≥90.0% - Excelente 89.9% a 71.0% - Aceptable ≤70.9% - No-aceptable

**Excelente:** apto como evaluador clínico en estudios con niveles de exigencia altos. **Aceptable:** apto como evaluador clínico en estudios con niveles de exigencia promedio. **No-aceptable:** no apto como evaluador clínico en proyectos de investigación.

México D.F. a 21 de nov de 2014.

X

Dra. Laurie Ann Jiménez Fyvie  
Responsable del curso



ISO 9001:2008  
COPANT/ISO 9001:2008  
NMX-CC-9001-INNC-2008

Círculo Institutos  
Cd. Universitaria  
México D.F. 04510

FE-GMLIFO-005