

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento de Odontología



Estudio experimental del uso de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 y ATCC PTA 5289 sobre índices de salud bucodental en una población escolar

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Carla Borrell García

Dirigida por:

Dra. Marta Ribelles Llop

Dra. M<sup>a</sup> Ángeles García Esparza

Dr. José María Tenías Burillo

VALENCIA

2015



**Estudio experimental del uso de  
*Lactobacillus reuteri* DSM 17938 y ATCC PTA  
5289 sobre índices de salud  
bucodental en una población escolar**

**Carla Borrell García**

2015

**Directores de tesis:**

**Dra. Marta Ribelles Llop**

**Dra. M<sup>a</sup> Ángeles García Esparza**

**Dr. José María Tenías Burillo**



DRA. MARTA RIBELLES LLOP, DRA. M<sup>a</sup> ANGELES GARCÍA ESPARZA Y DR. JOSÉ MARÍA TENÍAS BURILLO

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria titulada “Estudio experimental del uso de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 y ATCC PTA 5289 sobre índices de salud bucodental en una población escolar” de la que es autora Dña. Carla Borrell García, ha sido realizada bajo nuestra dirección, y reúne las condiciones científicas y formales para ser defendida ante el tribunal correspondiente, a fin de obtener el Grado de Doctora.

Y, para que conste a efectos oportunos, firmamos la presente en Moncada a 7 de julio de 2015.

Fdo.: Marta Ribelles Llop

Fdo.: M<sup>a</sup> Angeles García Esparza

Fdo.: José M<sup>a</sup> Tenías Burillo

## Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas, sin cuya ayuda no habría sido posible la realización de este trabajo:

- A mis directores de tesis: Marta Ribelles Llop, M<sup>a</sup> Ángeles García Esparza y José María Tenías Burillo, por su dedicación, su apoyo cuando las fuerzas flaqueaban y por estar ahí siempre cuando lo he necesitado.
- A todo el personal del Colegio Escolapias de Gandía (Valencia) por participar en este proyecto. En especial a Eva Estruch por poner tanto entusiasmo en que todo saliese bien.
- A Antonio Flichy y Regina Izquierdo. Sin su ayuda y colaboración este trabajo no hubiese sido posible.
- A todos mis compañeros de la Universidad Cardenal Herrera-CEU de Valencia, por prestarme su ayuda cuando la he requerido.
- A esos amigos incondicionales que siempre están al lado de uno cuando se les pide un favor. Gracias M<sup>a</sup> Ángeles y Pepe.
- A mi familia, en especial a ti mamá, por estar siempre ahí no importa el día y la hora con que te avise.
- A ti Carlos, por apoyarme, acompañarme, levantarme en los momentos duros de este camino, por tu paciencia y comprensión.
- Y por último, gracias a ti. Aún no estás aquí, pero te siento y esa fuerza hace que todo tenga sentido.

## ÍNDICE

<b>Introducción.....</b>	<b>8</b>
1. Importancia del control de la placa dental en la prevención de la caries dental y la enfermedad periodontal .....	9
1.1 Placa bacteriana y su implicación en la caries dental.....	10
1.2 Placa bacteriana y su implicación en la enfermedad periodontal.....	13
2. Definición de probióticos.....	14
3. Antecedentes históricos sobre el uso de probióticos.....	14
4. Mecanismo de acción de los probióticos.....	16
5. Efectos beneficiosos y limitaciones del uso de probióticos en el paciente pediátrico.....	17
5.1 Efectos beneficiosos del uso de probióticos en el paciente pediátrico.....	17
5.2 Limitaciones del uso de probióticos en el pacientes pediátrico.....	19
6. Formas de administración, dosis y márgenes de seguridad.....	21
7. Tipos de probióticos.....	22
8. <i>Lactobacillus reuteri</i> .....	23
9. Estado actual de las investigaciones de los probióticos en la prevención de la caries dental.....	24
10. Estado actual de las investigaciones de los probióticos en la prevención de la enfermedad periodontal.....	29
<b>Objetivos.....</b>	<b>35</b>
1. Objetivo principal.....	36
2. Objetivos específicos.....	36

<b>Material y métodos.....</b>	<b>37</b>
1. Diseño del estudio.....	38
2. Características de la muestra.....	39
3. Material.....	40
4. Metodología.....	41
5. Estrategia de análisis.....	47
<b>Resultados.....</b>	<b>49</b>
1. Análisis del efecto de los probióticos sobre los índices de salud bucodental.....	52
1.1 Análisis del efecto longitudinal del empleo de probióticos sobre el índice de placa.....	52
1.2 Análisis del efecto longitudinal del empleo de probióticos sobre el índice gingival.....	54
1.3 Análisis del efecto longitudinal del empleo de probióticos sobre el índice de hemorragia.....	55
1.4 Análisis del efecto longitudinal del empleo de probióticos sobre el pH.....	56
1.5 Análisis del efecto longitudinal del empleo de probióticos sobre los niveles de <i>S. mutans</i> en placa y saliva .....	57
1.6 Análisis del efecto longitudinal del empleo de probióticos sobre los niveles de <i>Lactobacillus sp.</i> en saliva.....	59
2. Estudio de los hábitos dietéticos e higiénicos por medio de una encuesta.....	60
2.1 Estudio de hábitos dietéticos.....	60
2.2 Estudio de hábitos de higiene bucodental.....	63
3. Relación de hábitos dietéticos e higiénicos con indicadores de salud bucodental...	64

4. Relación de hábitos dietéticos e higiénicos con indicadores de salud bucodental según edad y sexo.....	64
<b>Discusión.....</b>	<b>71</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>82</b>
<b>Referencias bibliográficas.....</b>	<b>84</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>94</b>
Anexo 1: Carta al director del colegio. ....	95
Anexo 2: Carta a los padres con consentimiento informado.....	96
Anexo 3: Hoja de registros.....	98
Anexo 4: Encuesta de dieta y hábitos de higiene bucodentales.....	100
Anexo 5: Informe de investigación por la Comisión de Investigación y Ética de la Universidad Cardenal Herrera-CEU de Valencia.....	101

# **INTRODUCCIÓN**

## 1. Importancia del control de la placa dental en la prevención de la caries dental y la enfermedad periodontal

La placa bacteriana constituye el factor etiológico más influyente para el desarrollo de las dos enfermedades bucodentales de mayor prevalencia, la caries dental y la enfermedad periodontal. Por este motivo, el control de la placa bacteriana mediante métodos mecánicos y químicos constituye la principal medida preventiva de la que disponemos para el control de ambas enfermedades (1).

Se puede definir la placa dental como una masa blanda, tenaz y adherente de colonias bacterianas que se adhiere a la superficie de los dientes, las encías y otras superficies bucales como prótesis o material de restauración cuando no se practican métodos de higiene bucal adecuados (1, 2).

La formación de la placa bacteriana dental tiene lugar en tres etapas: 1) depósito de la película adquirida, 2) colonización de la película por diferentes especies bacterianas, y 3) maduración de la placa. Cuando transcurren 24 horas sin cepillado empiezan a adherirse a la superficie limpia de un diente especies de tipo cocáceo, básicamente *Streptococcus sp.* aerobios. Durante el segundo día las bacterias inicialmente acumuladas van a ser invadidas por numerosos filamentos que se orientan perpendicularmente a la superficie, iniciándose así el proceso de sucesión microbiana autógeno. El descenso del potencial de óxido-reducción de la placa bacteriana va preparando el medio a las especies anaerobias. Pasadas 48 horas se detectan ya formas bacilares (*Actinobacillus sp.*), coco-bacilares y diplococos gram-negativos (*Neisseria sp.*). A los 4 días se observa la proliferación de bacilos fusiformes, bacteroides, difteroides y hongos filamentosos. A los 7 días se desarrollan espiroquetas, comenzando la maduración de la placa, que terminará aproximadamente pasadas dos semanas. Así al cabo de tres semanas se puede observar una distribución irregular de microcolonias en las que se observan tanto cocos como filamentos (2). Cuando la placa bacteriana está localizada por encima de la encía se llama placa supragingival, mientras que si está por debajo de la encía se llama subgingival. Por lo general la placa supragingival es adherente y principalmente cariogénica. Por otro lado, la placa subgingival es menos adherente que la supragingival y es preferentemente periodontopatogénica (1).

El control de la placa dental es fundamental en la prevención de la caries dental y de la enfermedad periodontal. Actualmente el enfoque del tratamiento de la enfermedad de caries tiende a ser preventivo y no tanto restaurador. Las estrategias preventivas se orientan hacia la intercepción de cada uno de los factores implicados en la etiología de la caries dental. Por tanto, la actuación del odontólogo se basa en aconsejar modificaciones en la dieta, aplicar estrategias orientadas a aumentar la resistencia del diente, como la administración de flúor y la aplicación de selladores de fosas y fisuras, y por último, no

siendo menos importante, actuar contra la placa dental, bien sea de forma mecánica mediante la enseñanza del cepillado o de forma química con la utilización de un antiséptico bucal como la clorhexidina (3, 4). La higiene bucal es la clave de la prevención de la caries dental y la base del éxito del tratamiento de la gingivitis. Muchos fracasos del control del tratamiento de las dos grandes enfermedades producidas por la placa bacteriana pueden atribuirse a una higiene inadecuada (5). Por ello es importante conseguir que los individuos desde edades tempranas sean capaces de adquirir la destreza adecuada en el cepillado y así eliminar la placa dental de forma correcta (4, 6, 7). El control químico consiste en la utilización de agentes antimicrobianos como un método auxiliar para el control de la placa en pacientes diagnosticado de alto riesgo de caries. Los más utilizados son la clorhexidina, la povidona iodada al 10%, el xilitol y el ozono (4).

Hoy en día se considera esencial el uso de flúor como estrategia preventiva complementaria. El flúor previene la aparición de la caries interfiriendo en el metabolismo de las bacterias reduciendo su papel patógeno y facilita la incorporación de calcio a los tejidos duros del diente y su remineralización (8).

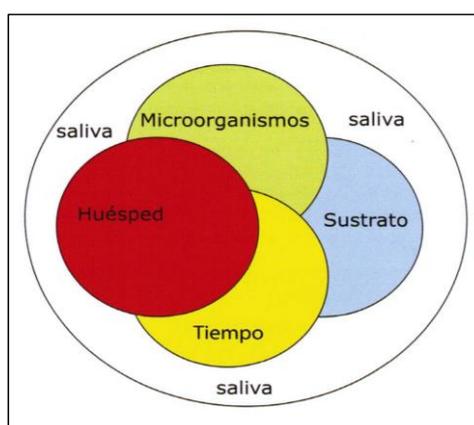
### **1.1. Placa bacteriana y su implicación en la caries dental**

La caries dental es una enfermedad infecciosa de origen microbiano, localizada en los tejidos duros dentarios, que se inicia con una desmineralización del esmalte provocada por ácidos orgánicos resultado de la acción de bacterias orales específicas que metabolizan a los hidratos de carbono de la dieta (4, 6, 9-13). Cuando progresa la lesión de caries, los microorganismos se dirigen hacia el interior del diente e infectan la dentina, ya que ésta es una estructura orgánica mineral mucho más blanda, ideal para el estancamiento de los microorganismos. Actualmente sabemos que en la cavidad oral se produce un ciclo continuo de desmineralización y remineralización en la superficie del diente, por lo que podemos considerar la lesión de caries como un proceso dinámico (14). Si el pH en la superficie del diente se sitúa por debajo de 5.5 se producirá una desmineralización con liberación de iones calcio y fosfato que quedarán en la saliva. Como la saliva es una solución saturada de estos iones, existe la posibilidad de que vuelvan a la superficie del diente cuando se recupere el pH. Si el pH de la saliva sube por encima de 5.5 se favorecerá la vuelta de los iones perdidos y toda lesión que sólo afecte al esmalte podrá remineralizarse. Si este equilibrio se rompiera y predominara la desmineralización (debido a periodos prolongados de acidez) se producirá la pérdida de componente mineral, creando una cavidad en el diente que supondrá la necesidad de un tratamiento restaurador en el que se procederá a la eliminación de la lesión de caries y recuperación del tejido perdido mediante un material restaurador (6, 9, 14).

Aunque la prevalencia de la caries dental en niños ha disminuido de forma marcada en los últimos 20 años, en la mayoría de países occidentales la enfermedad continúa siendo uno de los mayores problemas de Salud Pública. La caries dental es la enfermedad crónica más común en la infancia, con una proporción 5:1 si la comparamos con la enfermedad que le sigue en prevalencia, el asma (15).

La Organización Mundial de la Salud (WHO 2003) estimó que 5 billones de personas en todo el mundo sufrían caries. El alto porcentaje de niños con caries obtenidos en países del primer mundo han demostrado que el 17% de niños entre 1.5 y 4.5 años, el 33% de niños entre de 5 y 8 años y el 50% de niños mayores de 8 años han tenido historia de caries en la dentición temporal (16). Estas cifras nos ilustran sobre la necesidad de conocer y estudiar la enfermedad de caries a través de los factores de riesgo individuales y tomar medidas más específicas dirigidas no sólo a la población con alto riesgo de la misma, sino de forma general, y en pacientes que no presenten lesiones, con un fin preventivo (14, 17). Son muchos los factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de la caries dental. Fue Paul Keyes en 1960 quien estableció de forma teórica y experimental cómo la etiopatogenia de la caries dental obedece a la interacción simultánea de tres elementos o factores: el factor “microorganismo”, que en presencia de un factor “sustrato” logra afectar a un factor “huésped”. Su presentación esquemática se conoce como la Triada de Keyes, donde observamos la interrelación de estos tres elementos provocando el desarrollo de la enfermedad de caries. Sin embargo debe tenerse en cuenta otro factor determinante, el factor tiempo, imprescindible en la interacción de los mismos para que se produzca la enfermedad, considerándose como la Triada de Keyes modificada (18). Hoy en día se emplea una nueva representación de estos factores, donde cobra especial relevancia el factor “saliva” como se puede ver en la **Figura 1**.

**Figura 1.** Diagrama de Keyes actualizado (4).



De todos los factores relacionados con el desarrollo de la caries dental, el “*factor sustrato*” ocupa un papel primordial. Este *sustrato* consiste en la ingesta principalmente de azúcares fermentables en el medio bucal, por la acción de bacterias cariogénicas. El control de la dieta es un punto importante en la

promoción de la salud actual y en la prevención de la caries dental. Se deben fomentar estilos de alimentación saludables no sólo para evitar la instauración de la enfermedad de caries, sino también para mejorar el estado de salud general de nuestros pacientes y su calidad de vida. Los alimentos con mayor potencial cariogénico son los que contienen azúcares refinados y de consistencia adhesiva, teniendo en cuenta que la frecuencia de su ingestión es más importante que la cantidad ingerida (19). Por lo tanto, una dieta pobre en hidratos de carbono refinados y rica en vitaminas y minerales, sobre todo calcio, es la más aconsejable para mantener una boca sana. Es recomendable no abusar de alimentos ricos en azúcar (dulces, bollería, caramelos, bebidas azucaradas), procurando reducir la frecuencia del consumo de estos alimentos y que se tomen solo durante las comidas principales. Los alimentos más ricos en vitaminas, minerales y calcio son los lácteos, verduras y frutas frescas. Es conveniente evitar comer entre comidas, ya que los restos alimenticios permanecen en contacto con los dientes y se producen continuas bajadas de pH que favorecen la desmineralización y facilitan el desarrollo de lesiones de caries (8, 20-24).

Se considera *factor huésped* a las condiciones específicas de cada individuo (factores hereditarios, endocrinos o inmunológicos, alteraciones en la saliva y malposición dental) que explican que unos individuos tengan mayor predisposición a padecer lesiones de caries que otros teniendo similares hábitos higiénicos y alimenticios (25).

Keyes en 1960 demostró que hámsters con lesiones de caries activa presentaban en su placa bacteriana microorganismos cariogénicos, concretamente *Streptococcus sp.*, que sin embargo estaban ausentes en la placa analizada de hámsters sin caries (1). Actualmente se acepta que la cariogenicidad de la placa dental depende de la presencia en ella de bacterias capaces de reducir el pH hasta niveles en los que se produce la desmineralización de los tejidos duros (26). Cuando se habla del *factor microorganismo* se hace referencia a las bacterias que conforman la placa dental supragingival, la cual se localiza en las superficies lisas de los dientes, en las caras proximales y en surcos y fisuras. A medida que la lesión de caries progresa se da una transición de bacterias anaerobias facultativas gram-positivas, que predominan en las etapas iniciales de la lesión, a bacterias anaerobias estrictas gram-positivas y gram-negativas que predominan en lesiones de caries avanzadas. Se ha demostrado que *Streptococcus mutans*, coco gram-positivo anaerobio facultativo, presente en la placa bacteriana, está implicado en el inicio de la lesión de caries, y además también se puede aislar en todas las lesiones de caries profundas examinadas. Los lactobacilos son bacilos gram-positivos anaerobios facultativos que están implicados en la progresión de la lesión de caries y prevalecen en las etapas avanzadas de la misma. En general, los lactobacilos en la cavidad bucal son considerados como bacterias cariogénicas. Sin embargo, algunas especies pueden estar asociadas como indicadores de buena salud bucal. Este puede ser uno de los motivos por los que en la bibliografía encontramos resultados contradictorios en los resultados de lactobacilos (27). Como resultado de sus propiedades cariogénicas, durante varias décadas las investigaciones han asociado el género

*Lactobacillus* con lesiones en estados avanzados en la dentina (28). Sin embargo, hay investigaciones que sugieren que no todas las cepas de *Lactobacillus sp.* tienen un efecto inductor de caries. Por el contrario, parece ser que ejercen un papel protector para evitar el desarrollo de la misma. Este efecto se debería a su capacidad para competir con otros microorganismos cariogénicos, tales como *S. mutans* y *Streptococcus sobrinus*, e inhibir su crecimiento (29). Sin embargo, no existe mucha información sobre el beneficio que los lactobacilos producen en la cavidad oral (30-37). El género *Bifidobacterium*, formado por bacterias gram-positivas anaerobias, prevalece en las caries profundas y el género *Actinomyces*, en especial *Actinomyces viscosus*, bacilo filamentoso gram-positivo, está asociado con la caries radicular. Algunas especies son aerobias, mientras que otras son facultativas anaerobias, como *Actinomyces viscosus* (38, 39).

## 1.2. Placa bacteriana y su implicación en la enfermedad periodontal

En el momento del nacimiento la cavidad oral es estéril, aunque rápidamente se inicia la colonización bacteriana, constituyéndose la llamada flora microbiana oral o microbiota donde cohabitan aerobios, anaerobios estrictos, especies saprófitas y patógenas (40). El equilibrio puede alterarse por factores exógenos como el acúmulo de placa y la ingesta de fármacos, o endógenos como las enfermedades sistémicas y/o de origen genético (4). La placa bacteriana localizada en el margen gingival, supra o subgingival, es la iniciadora de la enfermedad periodontal, sobre todo la placa subgingival que tiene un mayor contacto con los tejidos de soporte del diente. Esta última está formada por bacterias anaerobias, gram-negativas, formas móviles y espiroquetas, localizadas en el área subgingival denominada bolsa periodontal donde se dan condiciones ambientales favorables que favorecerán su desarrollo (anaerobiosis, aumento del pH, descenso potencial óxido-reducción, menor autólisis). La placa bacteriana implicada en la etiopatogenia de la enfermedad periodontal se caracteriza por tener una menor proporción de bacterias acidogénicas y, por el contrario, abundar en ella las bacterias ureolíticas, como las del género *Neisseria*, productoras de ureasas que metabolizan sustratos nitrogenados provenientes de la saliva (urea, ácido úrico, creatinina y aminoácidos) y liberando amoníaco que reacciona con el ácido carbónico para formar como producto final carbonato de amonio, que eleva el pH de la placa (1). También se ha visto que *Actinobacillus actinomycetemcomitans* está asociado con las periodontitis agresivas, el género *Prevotella* en las enfermedades periodontales crónicas y *Porphyromonas gingivalis* como bacteria implicada en el comienzo y posterior desarrollo de la periodontitis participando en la formación de la bolsa periodontal, destrucción del tejido conectivo y reabsorción del hueso alveolar a través de un mecanismo inmunopatogénico. Así pues, la microbiota es polimicrobiana y mixta, siendo la enfermedad muchas veces consecuencia de estas asociaciones bacterianas complejas (40).

## 2. Definición de probióticos

En el año 2002 la Organización de Agricultura y Alimentos de las Naciones Unidas (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) definen a los probióticos como “microorganismos vivos que administrados en cantidades suficientes proveen efectos fisiológicos beneficiosos sobre el huésped” (11, 27, 28, 39, 41-62).

Dicho de otro modo, un agente probiótico puede ser definido como una formulación dietoterápica que contiene un número adecuado de microorganismos vivos, los cuales poseen la capacidad de modificar la flora bacteriana ejerciendo un efecto positivo y beneficioso para la salud (63).

## 3. Antecedentes históricos sobre el uso de probióticos

Existe una larga historia relacionada con la presencia de microorganismos vivos en los alimentos, en particular las bacterias ácido lácticas, fermentadoras de la lactosa. Ya en el año 76 a.C. el historiador romano Plinio recomendaba la administración de leche fermentada para el tratamiento de la gastroenteritis (27).

La bacterioterapia es una manera alternativa de combatir las infecciones a través de la administración de bacterias inocuas que desplazan a los microorganismos patógenos (28). Los probióticos inicialmente se desarrollaron para la prevención de las infecciones intestinales y en el tratamiento de la diarrea asociada al empleo de antibióticos, así como de la mala función intestinal. Existen estudios que han demostrado también su acción en la prevención de enfermedades alérgicas (63).

El galardonado con el premio Nobel en Fisiología y Medicina en 1908 Eli Metchnikoff, por sus trabajos en el Instituto Pasteur, fue el primero en señalar los efectos positivos para la salud desempeñados por ciertas bacterias a comienzos del siglo pasado (27, 64, 65). El científico ucraniano percibió una gran longevidad en la población búlgara de la época y propuso que esto se debía al consumo de yogur que contenía bacterias capaces de convertir el azúcar de la leche, lactosa, en ácido láctico. Sospechó que este ácido láctico hacía imposible el desarrollo de las bacterias dañinas en el intestino, y sugirió que el envejecimiento era consecuencia de la acción de las sustancias tóxicas producidas por la flora intestinal (27, 48, 64, 65).

En 1965 Lilly y Stillwell fueron los primeros en citar el término probiótico para describir cualquier sustancia u organismo que contribuyera a mantener el equilibrio intestinal en los animales (42, 60). Esta palabra se deriva de dos vocablos: del latín –pro- que significa por o a favor de, y del griego -

bios- que quiere decir vida (27). Según estos autores, serían sustancias segregadas por un microorganismo las que estimulan el crecimiento de otro (42).

Fuller (1989), con objeto de recalcar el carácter microbiano de los probióticos, definió de nuevo dicho término como un “suplemento dietético a base de microbios vivos que afecta beneficiosamente al animal huésped mejorando su equilibrio intestinal” (66, 67).

La creencia de los efectos beneficiosos de los probióticos se basa en el conocimiento de que la microflora intestinal proporciona protección frente a diversas enfermedades (64).

Varios autores coinciden en cuáles deben ser los criterios para que un microorganismo sea considerado un probiótico (42, 43, 49, 53, 55, 64, 68, 69):

- Ser de origen humano.
- No ser patogénico por naturaleza.
- Ser resistente a la destrucción por procedimientos tecnológicos.
- Resistencia a los ácidos del tracto digestivo (secreciones gástricas y bilis).
- Poder adherirse al epitelio intestinal.
- Colonización del intestino, incluso por cortos periodos.
- Producción de sustancias antimicrobianas.
- Capacidad de crecimiento.
- Efectos beneficiosos para la salud.
- Modular las respuestas inmunitarias.
- Ejercer una influencia en algunas actividades metabólicas humanas, como la asimilación del colesterol y la producción de vitaminas.

#### 4. Mecanismo de acción de los probióticos

El mecanismo de acción de los probióticos no está plenamente establecido, aunque en líneas generales se acepta que son capaces de mantener su viabilidad tras haber entrado en contacto con los ácidos gástricos, alcanzando y adhiriéndose a la mucosa intestinal, desde donde ejercen sus funciones compitiendo con los microorganismos patógenos y aumentando la inmunidad y resistencia a la infección por parte del huésped (64, 70).

Según Tormo, podemos resumir los mecanismos de acción de los probióticos en los siguientes (42):

- Las bacterias probióticas son acidófilas, acidogénicas y acidúricas. Es decir, pueden desarrollarse en pH ácido, generar ácidos (generalmente ácido láctico) que impidan el crecimiento de gérmenes patógenos y seguir descendiendo el pH por debajo de 4, expresando su máxima eficiencia.
- Los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* promueven la maduración del intestino y su integridad. Son antagónicos de patógenos y contribuyen a la modulación de la inmunidad intestinal.
- Ejercen influencia en la transferencia de plásmidos y en el establecimiento de transconjugados en el intestino.
- Poseen la capacidad de adherirse a enterocitos y colonocitos y afectan a la composición del ecosistema intestinal, incrementando el efecto barrera no dependiente del sistema inmunológico.
- Desempeñan un efecto competitivo con otras bacterias, ocupando sus lugares de nidación e inhibiendo el crecimiento de especies enteropatógenas.
- Aumentan la expresión de las mucinas ileocolónicas coadyuvando al recubrimiento del intestino de una capa de moco, eficaz en la lucha antibacteriana.
- Compiten con nutrientes de la flora intestinal patógena.
- Dificultan la translocación bacteriana.
- Pueden influir y modular las respuestas inmunitarias, en parte mediadas por el tejido linfoide asociado al intestino. Son capaces de aumentar la producción de  $\alpha$ -interferón por parte de linfocitos y macrófagos. Estimulan las células T *helper*, productoras de citoquinas y responsables de la inmunidad celular.

## 5. Efectos beneficiosos y limitaciones del uso de probióticos en el paciente pediátrico.

### 5.1. Efectos beneficiosos del uso de probióticos en el paciente pediátrico.

La incorporación del tratamiento antibiótico a mediados del siglo XX supuso un gran avance en el manejo de las infecciones; sin embargo, la rápida y creciente aparición de resistencias ha llevado a la búsqueda de nuevos métodos para combatir las enfermedades infecciosas (63). Por este motivo, algunos autores remarcan algunos de los beneficios que los probióticos aportan a los niños para evitar el uso de antibióticos y con ello el desarrollo de resistencias (27, 42, 43, 45, 48, 51, 63, 71-73).

La mayoría de los efectos beneficiosos de los probióticos se basan en su efecto de control de entidades patológicas que afectan a la salud en general. Recientemente los probióticos han sido propuestos como terapia adyuvante en el tratamiento de la diarrea aguda en niños. La mayoría de los estudios sobre los probióticos apoyan su eficacia en el tratamiento de la misma (36). *Lactobacillus rhamnosus GG ATCC 53103* (LGG) es el probiótico que más éxito ha mostrado (72, 73), disminuyendo la duración de la diarrea en aproximadamente un día (36, 74). LGG es una de las cepas probióticas más investigadas en el mundo. Ha sido estudiada ampliamente en humanos y en animales de laboratorio para una gran variedad de usos. LGG se aisló por primera vez en humanos en 1983 y presenta un historial seguro de uso en productos alimenticios desde 1990. La cepa presenta la mayoría de características propuestas para considerarse una buena cepa probiótica, incluyendo una excelente capacidad de supervivencia y colonización transitoria del tracto gastrointestinal basadas en su capacidad de adhesión a la mucosa intestinal y las células epiteliales (75).

En la prevención de la diarrea asociada a antibióticos, los agentes que con más frecuencia la causan son *Rotavirus* y menos común aunque de mayor severidad *Clostridium difficile*. (51, 73, 76). *C. difficile* fue descrito por primera vez en 1935 como parte de la microbiota normal de los neonatos. La alteración de la flora colónica por antibióticos de amplio espectro es el factor más habitualmente predisponente para desarrollar diarrea por *C. difficile*. Cualquier antibiótico puede producir diarrea, aunque los más frecuentes son clindamicina y cefalosporinas. Tras dicha alteración, esporas de *C. difficile* germinan, colonizan el tracto gastrointestinal y producen toxinas, con una respuesta inflamatoria subsecuente y daño del epitelio intestinal (77).

Arvola y cols. (78), realizaron un estudio con una muestra de 119 niños de edades comprendidas entre las dos semanas de edad y los 12,8 años (media de edad de 4,5 años) que recibieron tratamiento antibiótico como tratamiento de infecciones respiratorias, administrando  $2 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) de LGG en comprimidos. Estos niños recibieron el probiótico dos veces al día durante todo el tratamiento antibiótico. A las dos semanas de haber empezado el tratamiento

antibiótico, el grupo experimental redujo la incidencia de diarrea a un tercio en comparación con el grupo placebo. Vanderhoof y cols. (79) administraron  $1-2 \times 10^{10}$  (UFC/ml) de *LGG* diarias en forma de cápsulas a un grupo de 202 niños de edades comprendidas entre los 6 meses y los 10 años tratados con antibiótico oral por enfermedades infecciosas agudas del tracto respiratorio superior e inferior, del tracto urinario, de los tejidos blandos y de la piel. Los pacientes tratados con el probiótico mostraron frente al grupo tratado con placebo una disminución en la frecuencia de las deposiciones y un aumento de su consistencia.

No se han encontrado pruebas suficientes para recomendar el agregado de probióticos a los alimentos del neonato, con el fin de prevenir el desarrollo de enfermedades alérgicas o intolerancias alimentarias. Sin embargo, existen pruebas que apoyan la eficacia de los probióticos en el tratamiento del eccema en los niños. Dicho efecto podría no ser de gran significancia clínica, por lo que se necesitarían más estudios que confirmasen dichos resultados (43, 48, 50, 51, 80). Hasta el momento, los estudios que utilizaron *L. rhamnosus GG* fueron los más homogéneos en informar resultados beneficiosos sobre el eccema en los niños (45).

En procesos respiratorios como la rinoconjuntivitis y el asma, los trabajos realizados hasta ahora sugieren que los probióticos no desempeñan un papel importante en el tratamiento de tales procesos (43).

Otros efectos de los probióticos, como la disminución de la colesterolemia o el riesgo de carcinogénesis, han sido valorados tan sólo en el ámbito experimental y en pacientes adultos, por lo que son necesarios más estudios para extraer conclusiones (42).

En resumen, a nivel general, se ha demostrado la eficacia del uso de los probióticos en el tratamiento de los procesos infecciosos gastrointestinales, básicamente en los de origen vírico (42, 63), así como en las recaídas causadas por *C. difficile* (42) y en la diarrea asociada al uso de antibióticos (42, 45, 51, 63, 71, 73).

Los probióticos son un nuevo e interesante campo de investigación en microbiología oral, así como en la salud bucodental (64). Dado que existen estudios que han probado el papel de los probióticos en las afecciones gastrointestinales y teniendo en cuenta que la cavidad oral representa la puerta de entrada al tracto digestivo, algunos autores (44, 54, 55) sugieren que al menos algunas cepas probióticas también podrán alcanzar algún cometido en otros campos como las enfermedades orales, y entre ellas la enfermedad periodontal y la caries. El futuro de los probióticos en la prevención de estas dos enfermedades parece prometedor, aunque aún se necesitan más estudios clínicos a largo plazo que muestren sus efectos beneficiosos (38).

## 5.2 Limitaciones del uso de probióticos en el paciente pediátrico.

Al revisar el efecto de los probióticos en el tratamiento de la diarrea se considera que el efecto que éstos producen en su prevención todavía es limitado, debido a que solo un limitado número de microorganismos probióticos han sido estudiados (71, 73, 76). Además, no todas las cepas probióticas presentan la misma resistencia a los ácidos y a la bilis, ni presentan la misma capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal, por lo que no tienen la misma eficacia clínica (81). El efecto preventivo o terapéutico en otros procesos como los respiratorios, las alergias y el eccema necesitan nuevos estudios con demostraciones más evidentes (51).

Dos aspectos que aún no han sido claramente dilucidados se relacionan con la adherencia de la bacteria probiótica sobre las superficies orales, así como si el efecto inhibitor de caries del probiótico continúa después de su consumo (63). Aunque hasta la fecha el número de estudios que han sido realizados son limitados, los resultados son esperanzadores y predicen mayores avances en este campo.

Para lograr establecer el efecto cariostático deseado del probiótico, éste debería adherirse a la superficie dental y ser parte de la biopelícula, de manera que pueda competir con las bacterias cariogénicas. Para ello la bacteria probiótica debería administrarse de manera continua y lograr permanecer por un período prolongado (63). Sin embargo, parece improbable que se logre una colonización permanente del probiótico en la cavidad oral (36).

Yli-Knuutila y cols. (36) determinaron la colonización de LGG en la cavidad oral de estudiantes sanos y trabajadores de la Universidad de Helsinki de una media de edad de 25,8 años. A los 14 días tras finalizar el tratamiento el LGG en la cavidad oral decreció gradualmente. Al día siguiente de haber finalizado la administración del probiótico el 66% de los participantes en el estudio dieron positivo al cultivo de LGG. Después de 7 días solo el 3,6% tuvieron LGG en su saliva. Esto nos indica que se había producido una colonización temporal del probiótico.

En el estudio realizado por Sinkiewicz y cols. (74) se observó que la colonización de *L. reuteri* ATCC 55730 es temporal y desaparece de forma gradual al finalizar la pauta de experimentación. Afirmaron además que la colonización dependía de la cepa utilizada, ya que en su estudio utilizaron como probióticos dos cepas de *L. reuteri* ATCC 55730 y ATCC PTA 5289 y mostraron que esta última cepa tenía más propiedades de adhesión en un ratio de distribución de 1:4. La explicación del autor es que puede ser debido al origen de la cepa, ya que *L. reuteri* ATCC PTA 5289 es aislado de la cavidad oral.

Çaglar y cols. (35) administraron durante dos semanas *L. reuteri* ATCC 55730 diariamente en forma de comprimido masticable a 25 adultos jóvenes con edades comprendidas entre los 21 y 22 años

con el objetivo de determinar si *L. reuteri* ATCC 55730 podía ser detectado en la cavidad oral una vez finalizado el tratamiento con probióticos. A la semana de finalizar el tratamiento solo el 8% de los participantes albergaba el probiótico en la saliva, y a las cinco semanas ningún participante lo tenía.

Busscher y cols. (82) administraron bio-yoghurt dos veces al día (100 ml cada vez, tras el desayuno y la cena) durante una semana a 14 individuos con una media edad de 26 años. El objetivo de este estudio era comprobar si *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* colonizaban la cavidad oral de dichas personas. Después de una semana administrándoles bio-yoghurt concluyeron que tanto en la saliva como en la placa interproximal no había restos de dichas bacterias.

Otra limitación de estos productos radica en el tipo de cepa de probiótico utilizada, ya que hay probióticos con más capacidad de inhibir *S. mutans* que otros (83). Keller y cols. (84) realizaron un estudio *in vitro* para valorar la capacidad que tenían diversos productos comerciales de probióticos que contenían diversas especies de lactobacilos, para inhibir *S. mutans*, el cual fue aislado en 8 adultos jóvenes con una media de edad de 25 años y con distintos niveles de caries. Concluyeron que la cepa *Lactobacillus plantarum* era la que mostraba tener una mayor interferencia con *S. mutans*. Meurman y cols. (85) realizaron un estudio *in Vitro* utilizando específicamente como probiótico LGG y analizaron su capacidad para inhibir distintas especies bacterianas orales, entre ellas los estreptococos. En este caso observaron una inhibición en el crecimiento de *Streptococcus sobrinus*.

En un estudio *in vitro* llevado a cabo por Comelli y cols. (86) 23 cepas bacterianas con propiedades potenciales como probióticos orales fueron estudiadas para conocer sus efectos en la prevención de la caries dental. Cepas de *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) y *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) eran capaces de adherirse a la hidroxiapatita cubierta con saliva en la misma medida que *Streptococcus sobrinus* OMZ176. En particular, *S. thermophilus* NCC1561 y *L. lactis* NCC2211 se incorporaron con éxito a una biopelícula imitando la placa dental. *L. lactis* NCC2211 era capaz de modular el crecimiento de las bacterias orales, en particular disminuir la colonización del *Streptococcus oralis* OMZ607, *Veillonella dispar* OMZ493, *Actinomyces naeslundii* OMZ745 y del cariogénico *Streptococcus sobrinus* OMZ176.

El desconocimiento que existe actualmente sobre los probióticos y su efecto en la enfermedad periodontal es mayor si cabe que su efecto sobre la caries dental. Los esfuerzos que se están realizando principalmente en evaluar el efecto de los probióticos sobre parámetros clínicos (índice de placa, índice gingival e índice de hemorragia) y sobre la interferencia de éstos sobre la microbiota periodontal (81).

## 6. Formas de administración, dosis y margen de seguridad

Las principales formas de administración de probióticos son (48):

- Añadidos a bebidas (p. ej.: zumo).
- Inoculados en bebidas y productos lácteos (p. ej.: leche, yogur, queso).
- Liofilizados en suplementos dietéticos (p. ej.: comprimidos, chicles).

Sin embargo, la forma más frecuente en la que se presenta un alimento probiótico es el yogur. Así mismo, el consumo diario de productos lácteos es el modo más habitual de ingerir bacterias probióticas (28).

Busscher y cols. (82) encontraron que dos cepas de lactobacilos aisladas de un bio-yogurt, si bien podían adherirse sobre la superficie del esmalte éstas no lograban instalarse permanentemente sobre las superficies dentales de las personas evaluadas. Pensaron que probablemente existan factores dependientes del huésped que determinen el patrón de colonización en general (63).

No se han encontrado estudios que determinen la concentración de probióticos necesaria en cada forma de administración existente. Como regla general para ser efectivo en el tracto gastrointestinal la concentración de la bacteria probiótica no debería ser  $<10^6$  UFC/ml (55, 87). Sin embargo no existe evidencia científica que determine la dosis necesaria del probiótico en la cavidad oral para ser efectivo (39, 88).

El concepto de la ingestión de microorganismos vivos para el tratamiento de ciertas enfermedades infecciosas no está exento de controversias, una de las cuales es su posible poder patógeno (43). El aspecto más importante en cuanto a la seguridad de los probióticos es el riesgo de sepsis (39). Existen estudios que avalan la seguridad de estos microorganismos. En este sentido se han administrado diferentes cepas del género *Lactobacillus* a adultos y niños infectados por el VIH, a neonatos nacidos a término y a niños prematuros sin observar efectos secundarios significativos (89). Todos estos microorganismos no parecen suponer un riesgo para la salud (51, 90), pero hay que tener en cuenta la posibilidad de efectos secundarios como la inducción de resistencias a los antibióticos o que ellos mismos se comporten como agentes patógenos (56, 67). La mayoría de las especies usadas como probióticos pertenecen al género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. A estas bacterias se les considera que son seguras porque residen en el cuerpo humano sin causar ningún tipo de daño y, por otro lado, son microorganismos clave en la fermentación de la leche y en la preservación de alimentos (56).

En el año 2006 Weizman y cols. (91) realizaron un estudio cuyo objetivo era comparar la seguridad y la tolerancia de leche de fórmula suplementadas con distintos agentes probióticos en niños menores de 4 meses de edad. Se hicieron dos grupos y se les administró una leche de fórmula suplementada con *Bifidobacterium lactis* BB-12 (*B. lactis*) o bien con *L. reuteri* ATCC 55730. Se obtuvo una muestra total de 59 lactantes, a los cuales se les administró esta leche de fórmula durante 4 semanas, durante las cuales se midieron parámetros de crecimiento. Se observó su comportamiento durante estas 4 semanas y se controló también si aparecía algún efecto secundario o alguna característica que llamara la atención, como irritabilidad y llanto persistente. Concluyeron que el uso de leche de fórmula suplementada con *L. reuteri* o con *B. lactis* en lactantes era segura, bien tolerada y que no afectaba al crecimiento del niño ni en su comportamiento.

## 7. Tipos de probióticos

Por lo general, las bacterias empleadas como probióticos son bacterias ácido lácticas, pertenecientes principalmente a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque no exclusivamente (48, 49, 64, 91-98). En la **Tabla 1** se muestran los distintos géneros de bacterias más comúnmente utilizadas como probióticos.

**Tabla 1:** Bacterias empleadas como probióticas (64).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	Otros
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. breve</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>boulardii</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. longum</i>	<i>S. equinus</i>		<i>Propionibacterium.</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>B. adolescentis</i>			<i>freudenreichii</i>
<i>L. casei Shirota</i>	<i>B. lactis</i>			<i>E. coli</i>
<i>L. rhamnosus GG</i>	<i>B. infantis</i>			<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. johnsonii La 1</i>	<i>B. animalis</i>			
<i>L. helveticus</i>				
<i>L. plantarum</i>				
<i>L. salivarius</i>				
<i>L. reuteri</i>				
<i>L. lactis L1A</i>				
<i>L. thermophilus</i>				
<i>L. gasseri</i>				
<i>L. crispatus</i>				

El género *Lactobacillus* pertenece al grupo de bacterias productoras de ácido láctico (BAL) a partir de los carbohidratos de la dieta, facilitando la fermentación de los alimentos. Son bacterias comensales muy comunes en el tracto digestivo de los mamíferos (54, 89, 92, 99). Algunas especies de

*Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son residentes normales o que frecuentemente transitan por el aparato digestivo (49, 92).

*L. acidophilus* es la bacteria dominante en el intestino delgado, donde se hace la mayor parte de la digestión, mientras que *Bifidobacterium bifidum* reside en el intestino grueso donde se procesan los desechos para ser evacuados (48, 49, 92).

*Bifidobacterium* es la bacteria anaeróbica predominante en el intestino delgado y juega un papel clave en el mantenimiento del equilibrio de la flora intestinal. En la cavidad oral el género *Bifidobacterium* prevalece en las lesiones de caries profundas y tiene un papel clave en la progresión de la caries al igual que el género *Lactobacillus* (48). Sin embargo los lactobacilos están más asociados con la caries de dentina (36, 100).

A finales de 1980 una amplia gama de productos que contenían especies del género *Bifidobacterium* fueron introducidos en el mercado en múltiples países, y diversos estudios validaron la supervivencia y los efectos positivos de *Bifidobacterium DN-173 010* dentro del tracto gastrointestinal (48).

Como resultado de sus propiedades cariogénicas, el género *Lactobacillus* ha sido tema de gran interés en las investigaciones en el campo de la odontología durante varias décadas (11, 28, 39, 43, 45, 46). *L. reuteri* ATCC 55730 es ampliamente utilizado como probiótico en los productos lácteos. Se introdujo por primera vez en Suecia en leche suplementada en 1991 bajo el nombre comercial *BRA*, perteneciente a la compañía BioGaia® y actualmente productos lácteos que contienen *L. reuteri* ATCC 55730 son comercializados en los Estados Unidos de América, Finlandia, Japón, Korea, España, Portugal y el Reino Unido (41).

## **8. *Lactobacillus reuteri***

*L. reuteri* es una de las 3 ó 4 especies de lactobacilos que de forma natural habitan el tracto digestivo humano, tanto en niños como en adultos (74).

Se trata de una bacteria heterofermentativa, es decir la fermentación la realiza por la ruta de las pentosas fosfato con formación de ácido láctico, etanol y CO<sub>2</sub>. En 1962 la especie *L. reuteri* se diferenció de su estrechamente relacionado *Lactobacillus fermentum* (49, 90), pero no fue hasta 1980 cuando Gerhard Reuter la describió (41). *L. reuteri* ATCC 55730 ha sido ampliamente estudiada y se utiliza como aditivo de alimentos para mejorar la salud del aparato gastrointestinal de los humanos (101). Diversos

estudios han mostrado que la administración de esta cepa es segura (57, 89, 91) y reduce la incidencia y la severidad de la diarrea independientemente de su origen (71, 73).

*L. reuteri* tiene la capacidad de inhibir con éxito el crecimiento de microorganismos patógenos gracias a la combinación de diferentes mecanismos de acción como son la excreción de ácido acético y ácido láctico, así como de otros ácidos grasos, de peróxido de hidrógeno y de bacteriocinas (41, 102, 103).

Ha sido documentado además, que *L. reuteri* tiene efectos inhibitorios sobre algunas bacterias gram-positivas, como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. También ha sido demostrado su efecto inhibitorio en la bacterias gram-negativas, entre ellas *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* y *Pseudomonas fluorescens* (99).

## 9. Estado actual de las investigaciones de los probióticos en la prevención de la caries dental

La capacidad amortiguadora de las bacterias productoras de ácido láctico contenidas dentro de productos lácteos contrarresta la acidez, protegiendo las superficies dentales además de inhibir la adhesión de microorganismos patógenos (63). Además, no debemos olvidar la evidencia existente sobre las propiedades anticariogénicas de productos lácteos como la leche y el queso (85). La leche contiene múltiples proteínas que resultan beneficiosas sobre la salud oral. La caseína es una familia de proteínas que integra el 80 % de la proteína de la leche, que ayuda a reclutar los fosfatos de calcio que reparan la lesión de caries. La caseína también es capaz de prevenir la adhesión de bacterias en la superficie de los dientes. Por otro lado, las proteínas del suero de la leche que integran el otro 20 %, como las lizosimas, lactoferrina y anticuerpos pueden ayudar a promover la salud oral gracias a sus propiedades antibacterianas (104).

Sudhir y cols. (100) utilizaron como probiótico *L. acidophilus* y como vehículo de administración una cuajada, con el objetivo de ver el efecto que este probiótico mostraba sobre colonias de *S. mutans* en saliva. La utilización del probiótico en un producto lácteo fue justificada debido a la buena capacidad amortiguadora que tienen los productos lácteos. El estudio tuvo una duración de 30 días y fue realizado en una muestra de 40 niños de edades comprendidas entre 10 y 12 años. Se obtuvo una reducción estadísticamente significativa de *S. mutans* en saliva.

El papel protector de la leche con adición de probiótico fue también estudiada por Juneja y cols. (105). En su investigación utilizó la cepa *L. rhamnosus hct 70* en una muestra de niños de edades comprendidas entre 12 y 15 años y demostró el papel protector frente a la caries al producirse una reducción estadísticamente significativa en el recuento de *S. mutans*.

El papel de las bacterias probióticas en la prevención de la caries dental fue sugerido por primera vez en 1985. Se aislaron de las heces de las personas sanas cepas de *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus salivarius*, *Streptococcus faecium* y *Streptococcus equinus*, obteniendo posteriormente de las cepas unos extractos solubles en agua que más tarde mezclaron con saliva de individuos sanos *in vitro*, demostrando que estas bacterias ácido lácticas procedentes del intestino inhibían significativamente el crecimiento de *S. mutans* en saliva y, en menor grado, de otros estreptococos orales (64).

Principalmente para la prevención de la caries dental se ha usado como probiótico el *L.reuteri*, LGG y *Bifidobacterium sp.* entre otros (11, 37, 60, 84, 97, 106).

A continuación se detallan artículos que utilizaron *L. rhamnosus* y *L. reuteri* como probiótico y se explican las acciones correspondientes a cada uno de los microorganismos.

Marttinen y cols. (107) realizaron un estudio cuyo objetivo era exponer la placa dental a *L. rhamnosus GG* (LGG) y *L. reuteri* dos veces al día durante dos semanas y estudiar cambios en la producción ácidos en la placa, el recuento de microorganismos acidogénicos de la placa, de *S. mutans* y *Lactobacillus* y la retención de LGG y *L. reuteri* en la misma. La muestra constituida por 28 estudiantes con una edad media de 25 años, los cuales tenían que cumplir el requisito de tener unos recuentos salivares de *S. mutans*  $\geq 10^4$  (UFC/ml). Estos estudiantes tomaban dos comprimidos diarios de probiótico. La mitad de ellos tomaban comprimidos de LGG durante la primera semana y la otra semana *L. reuteri*, mientras que la otra mitad de estudiantes tomaron los comprimidos en el orden inverso. No se observaron cambios en la acidogenicidad de la placa después de haber tomado los comprimidos, ya fuese con LGG o *L. reuteri*, y los niveles de *S. mutans* permanecieron en el nivel original. El consumo de comprimidos con *L. reuteri* significativamente aumentó los niveles de lactobacilos. Al finalizar el tiempo de experimentación tan solo 6 sujetos presentaron *L. reuteri* y 4 presentaron LGG.

En un estudio prospectivo publicado por Stensson y cols. (108) se evaluó el efecto en la salud oral de suplementos diarios de *L. reuteri ATCC 55730* como probiótico. En este estudio participaron 188 madres embarazadas, las cuales consumieron cinco gotas de un aceite que contenía *L.reuteri* que derivaba de la leche materna. Estas gotas se les administraron durante las 4 semanas antes de la fecha probable de parto hasta que naciese el bebé. Desde el momento del nacimiento, a los niños/as se les administró diariamente cinco gotas vía oral del mismo aceite durante su primer año de vida. A los 9 años de edad los 188 niños fueron llamados para realizar un examen oral, incluyendo radiografías y la toma de muestras salivales. No hubo diferencia estadísticamente significativas entre el grupo experimental y el control respecto al recuento de *S.mutans* y *Lactobacillus sp.* en saliva. Aunque sí se observó un ligero descenso en la prevalencia de caries y de gingivitis entre el grupo experimental y el grupo control, éste no fue

significativo, concluyendo que no se puede confirmar que una temprana intervención con probióticos pueda mejorar la salud oral a largo plazo.

Nikawa y cols. (99) realizaron un estudio con una muestra de 40 estudiantes japoneses de 20 años de edad que fueron divididos en dos grupos de estudio con el objetivo de valorar el efecto de *L. reuteri* sobre los niveles de *S. mutans* en saliva. Al grupo de estudio se le dio yogurt con *L. reuteri* durante 4 semanas. Se observó como los niveles de *S. mutans* en saliva se redujeron de forma significativa en comparación con el grupo placebo.

Çaglar y cols. (32) realizaron un estudio que tenía como objetivo evaluar el efecto del *L. reuteri* ATCC 55730 sobre el recuento salival de *S. mutans* y *Lactobacillus sp.* en 120 adultos (21-24 años) tras su administración en dos formas diferentes, pastillas o pajitas recubiertas, durante un periodo de 3 semanas. Estas pajitas tenían en su superficie interna un aceite que contenía *L. reuteri* liberado únicamente al consumir una bebida. Ambas formas de administración del *L. reuteri* ATCC 55730 mostraron una reducción significativa de *S. mutans* y una reducción de los niveles de lactobacilos, aunque no estadísticamente significativa en comparación al grupo placebo.

En otro estudio, Çaglar y cols. (31) utilizaron como forma de administración del probiótico un nuevo producto sanitario. Consistía en un chupete en cuyo interior de la tetina insertaron la pastilla probiótica. La tetina contaba con unos pequeños orificios de 0,5 mm de diámetro a través de los cuales la pastilla se disolvía totalmente en la cavidad oral en unos 10-12 minutos. La muestra estuvo constituida por 20 mujeres jóvenes de 20 años de edad, las cuales durante 15 minutos al día tenían que chupar el chupete con el probiótico. Obtuvieron una disminución de *S. mutans* significativa utilizando *L. reuteri* ATCC 55730 y ATCC PTA 5289 como probiótico después de 10 días de utilizar el chupete.

Oron y cols. (98) realizaron un estudio utilizando el *L. rhamnosus* LB21 como probiótico. Durante dos semanas los participantes del estudio tomaron leche suplementada con el probiótico o sólo leche en el caso del grupo control. Al terminar las dos semanas se evaluó la placa supragingival y la saliva estimulada y comprobaron que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en cuanto a la disminución de los niveles de bacterias asociadas a la caries y en la cantidad de placa supragingival.

Ahola y cols. (109) quisieron estimar los cambios en la microflora oral tras la ingesta de queso con LGG y *Lactobacillus rhamnosus* LC 705 durante un corto periodo de tiempo (3 semanas). La muestra estaba constituida por 74 adultos jóvenes de edades comprendidas entre los 18 y 35 años a los que administraron 15 gramos de queso probiótico 5 veces al día, siempre tras las comidas. Se recogieron muestras salivales antes y después de la intervención, así como tres semanas después de la administración del queso probiótico, a partir de las cuales se realizó el recuento de *S. mutans*, lactobacilos, y levaduras.

También se registró el flujo salival estimulado y la capacidad tampón de la saliva, dada su implicación en el riesgo de caries. No hubo variaciones significativas en el recuento de *S. mutans* durante la intervención ni al finalizar ésta. No obstante, el cómputo de *S. mutans* y levaduras se vio disminuido en un 20 y 27 % respectivamente, mientras que el recuento de lactobacilos se vio incrementado. Resultados similares se mostraron en un trabajo realizado por Montalto y cols. (110) en el cual administraron a 35 adultos de una media de edad de 25 años una mezcla de diversas especies de lactobacilos (*L. sporogens* 16 %, *L. bifidum* 12 %, *L. bulgaricus* 12 %, *L. termophilus* 18%, *L. acidophilus* 20 %, *L. casei* 10% y *L. rhamnosus* 12%) tanto en forma líquida como en cápsulas durante un periodo de 45 días. Los resultados mostraron un aumento significativo en el recuento salival de los lactobacilos, fuera cual fuese la forma de administración. Sin embargo las poblaciones de *S. mutans* no se vieron alteradas.

Näse y cols. (29) contaron con una muestra de 594 niños finlandeses entre 1 y 6 años en cuyas guarderías se les administró durante 7 meses leche con la bacteria probiótica LGG y leche sin la bacteria al grupo control. El análisis de las muestras de saliva y placa confirmaron el antagonismo entre LGG y *S. mutans*, dada la disminución de colonias de *S. mutans* en el grupo experimental. Este efecto protector se hizo más patente en el grupo de edad de 3 a 4 años y, especialmente, en las superficies oclusales de los molares primarios.

A continuación se detallan estudios que utilizaron como probiótico distintas cepas del género *Bifidobacterium* como probiótico y se explican las acciones correspondientes a cada una de ellas.

Çaglar y cols. (34) realizaron un estudio cuyo objetivo era determinar si el consumo durante un periodo de 2 semanas de yogurt conteniendo *Bifidobacterium Dn-173 010* como probiótico afectaba los niveles salivares de *S. mutans* y *Lactobacillus sp.* en 21 adultos jóvenes de media de edad de 22 años. Se observó una reducción significativa en los niveles salivares de *S. mutans* en el grupo de estudio respecto al de control una vez terminó el consumo del yogurt. También se vio un descenso en el recuento de *Lactobacillus sp.*, aunque no significativo.

En otro estudio Çaglar y cols. (33) examinaron si el consumo de helado con *B. lactis Bd-12* podría afectar los niveles salivares de *S. mutans* y *Lactobacillus* en jóvenes adultos. La muestra consistió en 24 participantes con una edad media de 20 años. Durante 20 días tomaron diariamente helado con probiótico. Al terminar el periodo de intervención se observó un descenso significativo de *S. mutans* en el grupo de estudio y no significativo en el grupo control. El recuento de *Lactobacillus* no se vio alterado en ninguno de los dos grupos.

A continuación detallamos estudios donde utilizaron combinaciones de cepas del género *Lactobacillus* como probiótico y se explican las acciones correspondientes a cada una de las combinaciones.

Keller y cols. (111) estudiaron el efecto de dos cepas de *Lactobacillus sp.*, *L. reuteri DSM 17938* y *L. plantarum 299v*, en la producción de ácido láctico en la placa de forma *in vitro* e *in vivo*. En la primera parte de la investigación se añadió uno de estos dos probióticos en la placa dental supragingival de 25 adultos sanos de 27 años de edad media. Se analizó la producción de ácido láctico después de la fermentación con xilitol o fructosa. En la segunda parte de la investigación se les dio 3 comprimidos diarios conteniendo placebo o una de estas cepas de *Lactobacillus*: *L. reuteri DSM 17938* y *ATCC PTA 528918* como probiótico a 18 sujetos con una edad media de 26 años, y se determinó la concentración de ácido láctico en la placa supragingival a nivel basal y después del periodo experimental de 2 semanas. La placa con *L. reuteri DSM 17938* produjo significativamente menos ácido láctico en comparación con *L. plantarum 299v* o con el grupo control. La fructosa dio concentraciones mayores de ácido láctico que el xilitol. Respecto a la segunda parte del estudio, no se observó una diferencia estadísticamente significativa en la producción de ácido láctico en ninguno de los grupos de experimentación ni respecto al grupo control, ni a nivel basal ni después del periodo de experimentación. Los recuentos de *S. mutans* no estuvieron significativamente alterados después del periodo de intervención, pero el recuento de lactobacilos sí se incrementó significativamente en el grupo control.

Hasslof y cols. (112) realizaron un estudio experimental cuyo objetivo era evaluar los posibles efectos a largo plazo que se observan tras la ingesta de una dieta de cereales suplementada con *Lactobacillus paracasei F19*. La muestra estuvo constituida por 179 infantes de 4 meses de edad, a los cuales se les administraba el probiótico en el cereal hasta que el niño cumplía los 13 meses de edad. A la edad de 3, 6 y 9 años se evaluó el riesgo de caries con el recuento de *S. mutans* y *Lactobacillus sp.* No se observó ninguna diferencia entre el grupo control y el grupo experimental en el recuento de estas especies bacterianas, no pudiendo concluir que una dieta con *L. paracasei F19* durante el destete tuviese un efecto positivo en la disminución del riesgo de caries al considerar el análisis microbiológico del paciente.

También se han realizado estudios que incluyen en el mismo vehículo una combinación de varios microorganismos con acción probiótica. Cogulu y cols. (113) utilizaron una muestra de 104 sujetos con edades comprendidas entre los 20 y 27 años, en los cuales tras el consumo de probiótico o de placebo durante 3 semanas, se vio un descenso significativo de *S. mutans* y de *Lactobacillus sp.* El probiótico utilizado fue Kéfir, un producto lácteo fermentado al que se le inoculó varios microorganismos *Lactococcus lactis sp. lactis*, *Lactococcus lactis sp. cremoris*, *Lactococcus lactis sp. diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides sp. cremoris*, *Lactobacillus kefir*, *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces unisporus*.

Como resumen, en la **Tabla 2** se ha expuesto una síntesis de los estudios más recientes que existen en la literatura sobre el efecto de los probióticos en la cavidad oral.

**Tabla 2:** Estudios relacionados con la prevención de la caries dental (64, 100). LB: *Lactobacillus* sp. SM: *S. mutans*. ECA: ensayo controlado aleatorizado. DC: doble ciego. EAC: ensayo aleatorio cruzado.

Referencia	Tipo de estudio	N/edad	Microorganismo	Tiempo	Cometido en la cavidad oral
Näse y cols. (2001)	ECA, DC	594/1-6 años	<i>L. rhamnosus GG</i>	7 meses	Disminución SM en saliva
Ahola y cols. (2002)	ECA, DC	74/ 18-35 años	<i>L. rhamnosus GG</i> y <i>L. rhamnosus LC 705</i>	3 semanas	Disminución SM y levaduras en saliva
Montalto y cols. (2004)	ECA, DC	35/23-37 años	<i>Lactobacillus spp.</i>	45 días	Incremento LB en saliva
Nikawa y cols. (2004)	ECA, DC	40/20 años	<i>L. reuteri</i>	4 semanas	Disminución SM en saliva
Çaglar y cols. (2006)	ECA, DC	120/21-24 años	<i>L. reuteri</i>	3 semanas	Disminución SM en saliva
Çaglar y cols. (2008)	ECA, DC	20/20 años	<i>L. reuteri</i>	10 días	Disminución SM en saliva
Çaglar y cols. (2005)	EAC/ DC	21/ 21-24 años	<i>Bifidobacterium DN-173 010</i>	2 semanas	Disminución SM en saliva
Çaglar y cols. (2008)	EAC, DC	24/ 20 años	<i>Bifidobacterium lactis Bd-12</i>	20 días	Disminución SM en saliva
Sudhir y cols. (2014)	EAC, DC	40/10-12 años	<i>L. acidophilus</i>	30 días	Disminución SM En saliva.

## 10. Estado actual de las investigaciones de los probióticos en la prevención de la enfermedad periodontal

La enfermedad periodontal, asociada generalmente con el depósito de placa bacteriana, se caracteriza por signos clínicos iniciales como la inflamación gingival y sangrado y en estadios más avanzados con una profundidad de sondaje aumentada (114). Ciertas especies, predominantemente microorganismos anaeróbicos gram-negativos, son considerados patógenos para los tejidos de soporte dentales. Por lo tanto, la enfermedad periodontal está causada en su mayoría por infecciones producidas por estos microorganismos anaeróbicos gram-negativos que van desde una destrucción inicial de los tejidos conectivos blandos a una interrupción del hueso alveolar subyacente y del ligamento periodontal (55).

Determinar con exactitud la prevalencia de la enfermedad periodontal es difícil. Las publicaciones más recientes del Centro para el Control y Prevención de enfermedades (CDC) del 2012 estiman que el 8,51 % de los adultos de los Estados Unidos de América entre los 20 y 64 años tiene enfermedad periodontal, entendiéndose como tal tener una profundidad de sondaje  $\geq 4$  mm y  $\geq 3$  mm de pérdida de inserción (114). Según el Consejo de Dentistas, en el análisis de los datos recogidos en la Encuesta de Salud de España del 2010 (115), entre el 85-94 % de la población española mayor de 35 años presenta algún problema relacionado con las encías. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el

año 2003 indicó que la mayoría de niños tienen signos de gingivitis, y que en la población adulta se presenta una alta prevalencia de fases iniciales de la enfermedad periodontal. En Europa se estima que entre el 15-35 % de la población adulta padece esta enfermedad multifactorial (55).

Existe evidencia científica que indica que el tratamiento quimioterapéutico, como el uso de la clorhexidina y los antibióticos, son un complemento al raspado y alisado radicular en la mejora de la enfermedad periodontal (114). Sin embargo, la CDC ha identificado el inconveniente de las resistencias antibióticas como uno de los problemas que encontramos cada vez más debido al resultado del uso de antibióticos, y nos dicen que “casi todos los tipos de bacterias se han vuelto más resistentes y menos susceptibles a los tratamientos antibióticos” (116).

Las bases científicas que establecen que los probióticos previenen la enfermedad periodontal están todavía emergiendo, debido a la escasa bibliografía publicada respecto a este tema. Sin embargo, sí existen diversos productos comerciales en el mercado cuyo objetivo es la promoción de la salud periodontal, como son: Productos EvoraPlus<sup>®</sup> (de OragenicsInc<sup>™</sup>, una compañía Biofarmacéutica de Tampa, en Florida, Estados Unidos de América), los cuales tienen tres marcas registradas que contienen distintas cepas del género *Streptococcus* como son *Streptococcus oralis KJ3*, *Streptococcus uberis KJ2* y *Streptococcus rattius JH145* (117). La compañía de biotecnologías BioGaia<sup>®</sup> (Estocolmo, Suecia) son los fabricantes comerciales de los suplementos probióticos que contienen *L. reuteri* (ProDentis<sup>®</sup>) comercializado para la promoción de la salud oral (118). ProDentis es distribuido en los Estados Unidos de América bajo el nombre “Periobalance<sup>®</sup>” por, Inc./G.U.M (Chicago, Illinois) (119). En España lo podemos encontrar en las farmacias y parafarmacias, distribuido por la empresa SunStar Iberia S.L.U (Sant Just Desvern, Barcelona).

Los probióticos pueden influir sobre el biofilm oral modificando la microbiología del mismo. Se han observado varios mecanismos mediante los cuales los probióticos pueden ejercer su acción: regulando la inmunidad del huésped, tanto la innata como la adquirida, produciendo sustancias con capacidad antimicrobiana y compitiendo por el mismo nicho, ya sea impidiendo la adhesión de bacterias patógenas o bien mediante la competencia por los mismo nutrientes (26). Los probióticos pueden actuar sobre una amplia variedad de células para modular el sistema inmune y ejercer una acción antiinflamatoria. Las bacterias probióticas o sus productos (p. ej.: metabolitos, los componentes de la pared celular y el ADN) pueden ser reconocidos por las células del huésped, como las células epiteliales y las células inmunes (26, 55). Se ha observado que los probióticos son capaces de aumentar la capacidad fagocítica de los macrófagos, que pueden regular la expresión de los receptores de la fagocitosis de los neutrófilos en individuos sanos y potenciar la actividad de las células natural killer (55). También se ha demostrado que modulan la respuesta inmune a través de la inmunidad adaptativa (114).

Krasse y cols. (102) utilizaron en su estudio como vehículo de administración del probiótico, chicles que contenían una de las distintas cepas de *L. reuteri*, como son: (LR-1 y LR-2). La muestra estaba constituida por 20 adultos de 50 años de media de edad que presentaban gingivitis moderada o severa, en comparación con un grupo control. Los participantes de este estudio tenían que masticar chicle dos veces al día después del cepillado durante dos semanas. Las mediciones fueron recogidas en condiciones basales y una vez terminadas las dos semanas encontraron que ambos grupos de estudio, independientemente de la cepa utilizada, redujeron de forma significativa los índices de placa ( $p < 0,05$  para LR-1,  $p < 0,01$  para LR-2). El LR-1, además, mejoró de forma significativa el índice gingival comparado con aquellos que tomaron placebo ( $p < 0,0001$ ).

Twetman y cols. (120), quienes también midieron los efectos de chicles que contenían distintas cepas de *L. reuteri*, pero en individuos más jóvenes (24 años), añadieron otros parámetros para medir, como son la profundidad de sondaje y el índice de hemorragia. Después de dos semanas masticando chicle obtuvieron como resultado que el índice de hemorragia fue reducido significativamente en ambos grupos, pero no en el grupo control ( $p < 0,05$ ). En otro estudio llevado a cabo por Campus y cols. (121) también se evaluó la profundidad de sondaje y el sangrado durante las 6 semanas que duró el experimento. Se escogió a un total de 191 niños con edades entre los 6 y 8 años que presentaban dos o tres lesiones de caries y una concentración de *S. mutans* en saliva  $\geq 10^5$  UFC/ml. Se dividió a los participantes en dos grupos. Unos tomaron un comprimido de *L. brevis* CD2 y otros tomaron un comprimido placebo durante 6 semanas. Se vio una disminución significativa entre los dos grupos en el índice de sangrado y la profundidad de sondaje.

También se ha estudiado el efecto de *Lactobacillus salivarius-WB21* como probiótico en la enfermedad periodontal. Dos equipos de investigadores de Japón, Mayanagi y cols. (122) y Shimauchi y cols. (123), evaluaron el efecto de una cepa específica, *Lactobacillus salivarius-WB12*, en la enfermedad periodontal. El equipo de investigadores de Mayanagi evaluó si la administración oral de *L. salivarius-WB21* modificaba la población bacteriana de la placa supra/subgingival, mientras que el equipo de investigadores de Shimauchi evaluó el efecto de ese mismo probiótico en el estado periodontal de la misma muestra utilizada por Mayanagi. Para ello seleccionaron una muestra de 66 adultos con una edad media de 45 años de edad con enfermedad periodontal entre leve y moderada, administrándole al grupo test un comprimido de xilitol formulado con  $6.7 \times 10^8$  (UFC) de *L. salivarius-WB12* que debían disolver en la boca. Un factor importante a conocer de los participantes era saber si eran o no fumadores. El equipo de Shimauchi y cols. (123), después de realizar mediciones a las 4 y 8 semanas de administración del probiótico, concluyó que ambos grupos test mejoraron sus índices periodontales, pero no de forma significativa en comparación con el grupo control. Sin embargo, cuando se ignoró a los participantes no fumadores y se evaluaron las mejoras de los pacientes fumadores, se observó una gran mejoría

estadísticamente significativa en la profundidad de sondaje y en los índices de placa en relación con el grupo control.

Ishikawa y cols. (124) estudiaron como otra cepa de *Lactobacillus salivarius*, la *TI 2711 (LS 1)*, desplazaba bacterias periodontopatógenas como son *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*. Sugirieron que la *LS 1* era potencialmente un agente probiótico válido para obtener una disminución de bacterias periodontopatógenas.

Debe tenerse en cuenta el vehículo que se utiliza para la administración del probiótico. Slawik y cols. (125) y Staab y cols. (126) utilizaron leche como vehículo de administración, a la que se incorporó el probiótico. Staab y cols. (126) hicieron un estudio que tenía como objetivo determinar el efecto de la leche con el probiótico en la salud gingival. Participaron en el estudio 50 estudiantes de medicina sin signos clínicos de periodontitis con una edad media de 24 años. Durante 8 semanas tomaron leche con probiótico (*Lactobacillus casei* Shirota) una vez al día. Después de 8 semanas se evaluó el índice de sangrado, la placa interproximal y el índice de placa. Se observó un efecto beneficioso en el grupo que tomó el probiótico, ya que disminuyeron el sangrado, la gingivitis y la cantidad de placa, aunque no de forma significativa, en el grupo experimental respecto al control. Slawik y cols. (125) hicieron un estudio de 28 días de duración con una muestra de 28 adultos. Evaluaron parámetros periodontales como el índice de placa, el índice gingival, el fluido gingival crevicular y el índice de sangrado. Como resultados obtuvieron que la leche con el probiótico reducía el efecto de la gingivitis inducida por placa, pero se aumentaba la cantidad de placa. La explicación que ofrecieron fue el alto contenido en carbohidrato de la leche con probiótico que tomaron. El producto aplicado se comercializa en Alemania y es una leche que contiene *Lactobacillus casei* Shirota así como dextrosa y sacarosa.

Vivekananda y cols. (103) hicieron un estudio con una muestra constituida por 30 sujetos de edades comprendidas entre 34 y 50 años con enfermedad periodontal crónica. El objetivo era evaluar el efecto de *L. reuteri* sólo o en combinación con el raspado y alisado radicular durante 42 días. Se evaluaron tanto parámetros periodontales como son el índice de placa, el índice gingival, el índice de sangrado, la profundidad de sondaje y el nivel de inserción clínica, como niveles microbiológicos de patógenos (*Aggregibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*). Se obtuvo una mejoría estadísticamente significativa de los parámetros periodontales y de los niveles microbiológicos de patógenos en el grupo al que sólo se le dio el probiótico, siendo su eficacia mayor si se combinaba con el raspado y alisado radicular.

Otros autores se centraron más en el efecto de los probióticos sobre la microbiota oral. Iniesta y cols. (127) administraron comprimidos con *L. reuteri* en 80 participantes durante 8 semanas. Observaron una reducción significativa en el cómputo total de las bacterias periopatógenas estudiadas. Los resultados

obtenidos fueron similares a los de Mayanagi y cols. (122), que vieron cómo se redujo el número de cinco patógenos (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromona gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia*) después de 4 semanas de duración del estudio.

Como resumen, en la **Tabla 3** están expuestos los probióticos más estudiados en la enfermedad periodontal y los efectos que producen.

**Tabla 3:** Especies probióticas estudiadas específicamente desde una perspectiva de la enfermedad periodontal (55).

Probióticos	Efecto
<i>Lactobacillus casei</i>	Reducción de periopatógenos y extensión del periodo de remisión.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Mejora de parámetros clínicos en pacientes periodontales y cambio en la microflora local hacia coco gram-positivos y <i>lactobacilli</i> .
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Reducción de gingivitis y placa en pacientes con gingivitis.
<i>Streptococcus sanguinis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Streptococcus mitis</i>	Retraso en la recolonización subgingival del patógeno.
<i>Lactobacillus brevis</i>	Efecto inhibitorio del <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> , recuperación y colonización. Mejora de los signos y síntomas asociados a la periodontitis.
<i>Lactobacillus salivarius</i> WB-21	Mejora de los signos clínicos de la enfermedad periodontal en pacientes fumadores y no fumadores.

A pesar de haber disminuido en los últimos años, la caries dental continúa siendo la enfermedad infecciosa más frecuente en la infancia. En el año 2010 uno de cada dos jóvenes españoles entre los 12 y 15 años tenía caries en dientes definitivos y uno de cada tres tenía caries en dientes de leche (a los 5-6 años). Por otro lado, las enfermedades gingivales presentan varias características clínicas comunes, dentro de las cuales encontramos signos clínicos de inflamación de la encía y presencia de placa bacteriana iniciando y/o exacerbando la enfermedad.

La caries y la enfermedad gingival son patologías reversibles mediante la eliminación del factor etiológico. El papel que la prevención tiene en disminuir la incidencia de estas dos enfermedades, caries y enfermedad periodontal, es de suma importancia. Las investigaciones que se vienen realizando en los últimos años están enfocadas hacia el control de los microorganismos orales patógenos a través de la bacterioterapia con el uso de probióticos.

La actual visión de la etiología de la inflamación periodontal relacionada con la placa considera tres factores que determinan si la enfermedad se desarrollará en un sujeto: 1. La susceptibilidad del huésped, 2. La presencia de especies patogénicas y 3. La reducción o ausencia de las llamadas bacterias beneficiosas. En la adolescencia es importante instaurar medidas tan sencillas como fomentar la higiene

bucal, de esta manera se conseguirá tener menos cantidad de placa y mejorar la salud bucal repercutiendo positivamente tanto en una disminución de caries como de enfermedad periodontal.

En España no hemos encontrado investigaciones sobre el efecto que tienen los probióticos en la prevención de la caries dental y la enfermedad periodontal. A nivel mundial, la mayoría de estudios existentes sobre el efecto de los probióticos en la caries están realizados con muestras de adultos jóvenes, y respecto al efecto en la enfermedad periodontal las muestras de participantes alcanzan la edad adulta. Por este motivo el presente estudio pretende analizar la aplicación del probiótico *L. reuteri* DSM 17938 y ATCC PTA 5289 en una población de adolescentes sobre índices de salud bucodental y establecer posibles relaciones entre estos índices con hábitos dietéticos y de higiene bucodental.

# **OBJETIVOS**

### **1. Objetivo principal.**

Evaluar el efecto de la introducción de un producto probiótico sobre índices de salud bucodental en una población escolar de edades comprendidas entre los 12 y 18 años.

### **2. Objetivos específicos**

1. Estimar el índice de placa, el índice gingival, el índice de hemorragia, pH salival y los niveles de *S. mutans* y *Lactobacillus sp.* en una población de escolares valencianos que ingieran comprimidos probiótico o placebo.
2. Comparar los registros de índice de placa, índice gingival e índice de hemorragia realizados en condiciones basales, a los 7, 14, 21, 28 y 45 días después de haber ingerido el comprimido probiótico o placebo.
3. Comparar los registros de pH salival y los niveles de *S. mutans* y *Lactobacillus sp.* realizados en condiciones basales, a los 14, 28 y 45 días después de haber ingerido comprimido probiótico o placebo.
4. Relacionar hábitos dietéticos y de higiene bucal, recogidos mediante un cuestionario, con el índice de placa, índice gingival, índice de hemorragia, pH salival y los niveles de *S. mutans* y *Lactobacillus sp.*, todos ellos en condiciones basales obtenidos en ambos grupos de estudio, y evaluar la posible asociación de datos.
5. Relacionar los hábitos dietéticos y de higiene bucal en relación a la edad y el sexo del escolar.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

## 1. Diseño del estudio

Estudio experimental, aleatorizado y controlado con el objetivo de evaluar el efecto de la introducción de un producto probiótico sobre los índices de salud bucodental en niños valencianos de edades comprendidas entre los 12 y 18 años.

Entre los meses de febrero, marzo y abril de 2013 se realizó un estudio clínico longitudinal a doble ciego que tenía como objetivo comparar el pH salival, la placa bacteriana, el índice de hemorragia, el índice gingival, y los niveles de *S. mutans* y de *Lactobacillus sp.* de dos grupos de niños de edades comprendidas entre los 12 y 18 años que asistían al Colegio Escolapias de Gandía (Valencia) (**Figura 2**) después de haber ingerido un comprimido probiótico o placebo a lo largo de 28 días. También se relacionó el nivel de higiene dental y la dieta con los niveles basales de *S. mutans* y *Lactobacillus sp.*, el pH salival, el índice de placa, el índice gingival y el índice de hemorragia.

Entre las características del centro hemos de destacar que se trata de un colegio religioso y en la actualidad concertado, donde la mayoría del alumnado que asiste pertenece a la clase social media.



**Figura 2:** Fachada del Colegio Escolapias de Gandía (Valencia).

## 2. Características de la muestra

La muestra del estudio quedó constituida por 27 niños de edades comprendidas entre los 12 y 18 años.

### Selección de pacientes:

1. *Factores de inclusión:* Los individuos de la muestra son niños de edades comprendidas entre los 12 y los 18 años pertenecientes al Colegio Escolapias de Gandía (Valencia) que voluntariamente participan en el estudio previo consentimiento informado firmado por los padres.
2. *Factores de exclusión:* Niños menores de 12 años y mayores de 18 años, niños que tomen alguna medicación que se asocie con alteración salivar, niños portadores de aparatología de ortodoncia, topicaciones de flúor en el último mes, consumo habitual de probióticos o chicles de xilitol, antibióticos en el último mes, caries no tratadas o activas, niños que presenten algún tipo de patología del tipo psicológico, alteraciones de la marcha y/o síndromes no identificados. A la hora de firmar el consentimiento informado los padres deberán especificar si existe alguno de estos factores de exclusión.

### Cálculo de la muestra:

Para el índice de placa esperamos encontrar un cambio beneficioso asociado al probiótico de al menos 0,33 puntos (equivalente a un 20% del rango observado). Asumimos una variabilidad en la escala de 0,43 puntos (desviación estándar estimada en grupo piloto de 10 niños). Para detectar esta diferencia con una potencia del 80% (error beta del 20%) y una confianza del 95% (error alfa del 5%) sería necesario reclutar 27 pacientes por grupo. Para detectar un cambio de crecimiento en los niveles de *S. mutans* de al menos medio punto en la escala logarítmica (equivalente a un cambio en la escala lineal entre 10000 y 100000 ó entre 100000 y 1000000) con una variabilidad de 0,6 puntos (desviación estándar en la escala logarítmica), una potencia del 80% (error beta del 20%) y una confianza del 95% (error alfa del 5%) sería necesario reclutar 23 pacientes por grupo. Por tanto, con una elección conservadora sería suficiente con reclutar 27 pacientes por grupo para poder detectar los cambios relevantes en ambos indicadores.

Los participantes se escogieron de forma aleatoria distribuyéndolos en 2 grupos:

- A: Grupo experimental. Se les entregó un frasco a cada participante del estudio con 28 comprimidos probióticos.
- B: Grupo control. Se les entregó un frasco a cada participante del estudio con 28 comprimidos placebo.

Cada niño entró a formar parte de cada grupo de manera aleatoria.

- Grupo de niños que pertenecieron al grupo de estudio: COLOR ROJO.
- Grupo de niños que pertenecieron al grupo control: COLOR AZUL.

La aleatorización se realizó siguiendo los dos principios básicos de asignación equiprobabilística de cada sujeto a uno de los dos tratamientos y de ocultación de la asignación aleatoria.

La asignación equiprobabilística de cada unidad de análisis se consiguió utilizando un método de asignación basado en el orden alfabético de los apellidos de los niños (de la A a la M un grupo y de la N a la Z, el otro). Ambos grupos fueron creados y sorteados por un investigador externo mediante un proceso aleatorio (generación de un número aleatorio par/impar para asignar a uno de los dos grupos).

El investigador no conocía a que grupo iba a ser asignado cada sujeto cuando se le pidió el consentimiento informado con lo que se garantizó la ocultación de la secuencia de asignación.

### 3. Material

1. *Power point* explicativo para los padres.
2. Carta al colegio incluyendo el protocolo de estudio para obtener su consentimiento informado (*Anexo 1*).
3. Carta a los padres de los alumnos del colegio ofreciendo información en lenguaje sencillo para obtener su consentimiento informado (*Anexo 2*).
4. Consentimiento informado firmado del padre o tutor legal del niño (*Anexo 2*).
5. Vademécum para comprobar si algún fármaco que esté tomando el niño produce una alteración en la secreción salivar.
6. Hojas de registro de datos (*Anexo 3*).
7. Cuestionario con preguntas sobre la dieta y los hábitos higiénicos de los participantes en el estudio (*Anexo 4*).

8. Para la realización de la revisión dental se utilizaron espejos y sondas de exploración.
9. Para la realización del detartraje se utilizó un kit compuesto por un espejo, sonda de exploración, copa de goma, pasta de profilaxis y punta de ultrasonidos del nº 1 de SATELEC®.
10. Etiquetas de diferentes colores (rojo y azul) se utilizaron para dividir a los pacientes en los dos grupos de estudio.
11. Para el estudio se utilizaron comprimidos de probióticos (*L. reuteri*) y placebo. Los probióticos, así como el placebo de este estudio, fueron proporcionados por la empresa BioGaia® de Suecia. El probiótico utilizado fue BioGaia ProDentis®, el cual se trata de la combinación de dos cepas complementarias de *L. reuteri* como son *L. reuteri DSM 17938* y *ATCC PTA 5289*. Cada comprimido contiene  $1 \times 10^8$  UFC/ml de probiótico. Para la obtención de la saliva estimulada se utilizaron pastillas de cera parafinada.
12. Para la recogida de saliva de la cavidad bucal se usaron tubos de plástico estériles.
13. Kit de Dentocult® LB (Orion®) para determinar el número de colonias de *Lactobacillus sp.*
14. Kit de Dentocult® SM (Orion®) para determinar el número de colonias de *S. mutans*.
15. Para determinar el pH de la saliva se utilizó el pH-metro Consort (modelo C830).
16. Para calibrar el pH-metro se utilizaron soluciones buffer de pH 7,0 y 4,0.
17. Estufa de cultivo (JP SELECTA®) para la incubación de los kits.
18. El laboratorio Gum® obsequió a los participantes del estudio por su colaboración con cepillos y pastas dentífricas.
- 19.

#### 4. Metodología

##### Cronología del estudio

Tras la aprobación del informe de investigación por la Comisión de Investigación y Ética de la Universidad Cardenal Herrera-CEU de Valencia (**Anexo 5**), se solicitó una cita con el Director del colegio para explicarle con todo detalle en qué consistía el estudio y los pasos a seguir para poner en marcha el proyecto. Una vez obtenido el visto bueno por parte del A.M.P.A se concretó una cita con los padres para explicarles el estudio.

A finales de septiembre del 2012, coincidiendo con el inicio del curso escolar y con las reuniones informativas por parte de los tutores de cada curso, se convocó una reunión con los padres donde se proyectó una breve presentación en formato *Power Point* para explicar el objetivo del estudio en un lenguaje claro y comprensible para los padres. Una vez finalizada la exposición se entregó una carta

explicativa y se procedió a recoger el consentimiento informado firmado de aquellos padres cuyos hijos iban a participar.

A los estudiantes que participaron en el estudio se les citó para una revisión y una limpieza bucal dos meses antes del inicio del mismo en una clínica odontológica sita en Gandía. Se realizó el detartraje a todos los participantes el mismo día y se les entregó un kit compuesto por un cepillo y una pasta dental. Recibieron instrucciones de higiene oral con el fin de que todos los participantes del estudio tuviesen las mismas pautas de higiene durante el transcurso de todo el estudio. Asimismo, se les hizo entrega de un cuestionario con preguntas sobre dieta y hábitos higiénicos para valorar la relación de éstos con la valoración basal del ensayo.

Los comprimidos de probióticos/placebo que se observan en la **Figura 3** se insertaron en un bote de plástico con el nombre de cada participante del estudio. Los tutores de cada curso fueron los responsables de custodiar dichos botes en la sala de profesores del colegio. Por la mañana el tutor hacía entrega de un comprimido a cada alumno antes del recreo (11h). El viernes se le entregaba a cada participante una bolsa con dos comprimidos que correspondían al fin de semana. Este procedimiento se repitió durante los 28 días que duró el estudio. En el momento en que un participante no tomaba un comprimido inmediatamente era retirado del estudio.



**Figura 3:** Botes de plástico con comprimidos probiótico/placebo.

**A continuación se presenta el organigrama diario para la recogida de los datos**

**Día 1:** Recogida de muestras de saliva en condiciones basales para medir los niveles de *S. mutans*, *Lactobacillus sp.* y pH salival y medición del índice de placa, índice gingival e índice de hemorragia.

La recogida de muestras de saliva y la medición de los índices y del pH salival se llevó a cabo entre las 9 y las 11h de la mañana en aulas preparadas anteriormente con el material sobre la mesa. Un sólo operador fue el encargado de analizar todas las muestras obtenidas contando con la colaboración de los alumnos del Máster de Odontopediatría de la Universidad Cardenal Herrera-CEU de Valencia y personal del colegio debidamente entrenado, controlando que el proceso se desarrollase de la manera más exacta posible.

En un primer momento se procedió a la medición del índice de placa, índice gingival, e índice de hemorragia.

Para la cuantificación del número de colonias de lactobacilos se procedió a la recogida de saliva estimulada siguiendo las indicaciones del Kit de Dentocult<sup>®</sup> LB (Orion<sup>®</sup>). Se impregnó esta saliva con un bastoncillo para la siembra del medio de cultivo presente en el kit (**Figura 4**). Esta misma saliva se utilizó para la medición del pH salival, para lo cual se introdujo la varilla del pH-metro Consort (modelo C830), previamente calibrado con soluciones Buffer de pH 7,0 y 4,0, en el tubo con la saliva estimulada.



**Figura 4:** Método para la cuantificación del número de colonias de *Lactobacillus sp.*

Para la medición del número de *S. mutans* una vez el alumno hubo masticado la pastilla de parafina se le dijo que tragara cualquier exceso de saliva y que después presionara contra la lengua la superficie áspera de la lengüeta incluida en el kit Dentocult<sup>®</sup> SM (Orion<sup>®</sup>), como se ve en la **Figura 5**. Para retirar la tira el paciente tenía que cerrar suavemente los labios y tirar de ella. Posteriormente las muestras fueron incubadas durante 48 horas en una estufa de cultivo (JP SELECTA<sup>®</sup>) a 35-37°C para el

recuento de *S. mutans* y a 35-37°C durante 4 días en el caso de *Lactobacillus sp.*, siguiendo las instrucciones del fabricante.



**Figura 5:** Técnica para la cuantificación de colonias de *S. mutans*.

**Día 7:** Visita al colegio para la medición del índice de placa, índice de gingivitis e índice de hemorragia a los participantes del estudio.

**Día 14:** Se realizó el mismo procedimiento que realizamos el día 1, recogida de saliva estimulada para medir el pH salival, el número de *S. mutans* y de *Lactobacillus sp.*, y posteriormente realizamos la medición de los índices de placa, gingivitis y de hemorragia.

**Día 21:** Al igual que el día 7, se visitó el colegio para realizar la medición de los índices de placa, gingival y de hemorragia.

**Día 28:** Se realizó el mismo procedimiento que los días 1 y 14. Es decir, se recogió saliva estimulada para medir el pH salival, el número de *S. mutans* y de *Lactobacillus sp.*, y posteriormente se realizó la medición de los índices de placa, gingival y de hemorragia.

**Día 45:** Última visita al colegio para la recogida de muestras de saliva para la cuantificación de los microorganismos y del pH salival y la medición de los índices de placa, gingival y de hemorragia, transcurridos 17 días de la última toma del probiótico o placebo. La duración total del estudio fue de 45 días. A continuación se muestra una tabla resumen con los tiempos del estudio (**Tabla 4**).

**Tabla 4:** Esquema de los tiempos del estudio.

Día del estudio	Tipo de medición
1	Niveles basales del índice gingival, índice de placa, índice de hemorragia, pH salival, recuento <i>S. mutans</i> y <i>Lactobacillus sp.</i>
7	Índice gingival, índice de placa e índice de hemorragia.
14	Índice gingival, índice de placa, índice de hemorragia, pH salival, recuento <i>S. mutans</i> y <i>Lactobacillus sp.</i>
21	Índice gingival, índice de placa e índice de hemorragia.
28	Índice gingival, índice de placa, índice de hemorragia, pH salival, recuento <i>S. mutans</i> y <i>Lactobacillus sp.</i>
45	Índice gingival, índice de placa, índice de hemorragia, pH salival y recuento de <i>S. mutans</i> y <i>Lactobacillus sp.</i>

Para la medición del índice de placa se escogió el índice de Silness y Løe cualitativo (128), el cual permite establecer los distintos grados de intensidad del acúmulo de placa bacteriana, como se observa en la **Tabla 5**. Para las mediciones se consideraron los dientes de Ramfjord: 16-21-24-36-41-44; sobre estos dientes se pasó la sonda periodontal, como se observa en la **Figura 6**, por las cuatro caras del diente (vestibular, lingual/palatino, mesial y distal) y se evaluó según la cantidad de placa presente.

**Tabla 5:** Distintos grados de intensidad de placa bacteriana (128).

Grado	Características
0	No hay placa.
1	No hay placa a simple vista, si al paso del explorador.
2	Hay placa a simple vista.
3	Hay placa a simple vista y cálculo en el espacio interproximal.

Una vez colocado el valor que correspondía para cada diente se sumaron los valores de las 24 caras registradas y se dividió por 24, es decir, que el índice es el promedio de las 24 mediciones realizadas. En el caso de que el niño no presentase alguna de las piezas permanentes, ésta era reemplazada por el diente temporal que ocupaba ese lugar siendo 21 por 61; 24 por 64. Si el niño presentaba solo dientes temporales, los dientes de Ramfjord eran reemplazados por sus análogos temporales, es decir, si no estaba el 16 y 36 en boca se reemplazaba por el 54 y 74.



**Figura 6:** Uso de la sonda periodontal para la medición de los índices de placa, gingival y hemorragia.

Para la medición del índice gingival también se utilizó el índice de Silness y Løe (128), cuyos grados y características asociadas se explican en la *Tabla 6*. Dicho índice también utiliza los dientes de Ramfjord: 16-21-24-36-41-44. El procedimiento es igual que en el índice de placa, es decir, se pasa la sonda periodontal en las cuatro caras del diente (vestibular, palatino/lingual, mesial y distal) y se anota un valor según el grado de inflamación.

**Tabla 6:** Características del índice gingival de Silness y Løe (128).

Grado	Características
0	Ausencia de inflamación
1	Inflamación leve: cambio de color y textura.
2	Inflamación moderada: enrojecimiento, edema, sangra al sondaje.
3	Inflamación severa: enrojecimiento, hipertrofia, sangrado espontáneo, ulceración.

Se coloca el valor que corresponde para cada cara del diente, se suman los valores de las 24 caras registradas y se divide por 24. Es decir, que el índice gingival, al igual que en el índice de placa, es el promedio de las 24 mediciones realizadas. El índice gingival está indicado sólo para dientes permanentes, dado que los parámetros que se considera para establecer si la encía está inflamada y el grado en el que lo está sólo se define para dentición permanente, ya que la dentición temporal presenta características clínicas de inflamación asociadas al proceso de recambio que podrían sesgar la información recogida. Por lo tanto, si el paciente no presentaba en boca alguno de los dientes de Ramfjord éste no era reemplazado

por ningún otro, y el promedio se hizo sumando los valores obtenidos y dividido por la cantidad de superficie medidas.

Por último, se utilizó el índice de hemorragia simplificado (128) cuyos posibles valores se detallan en la **Tabla 7**. Al igual que los dos índices anteriores, en este índice también se utilizan los dientes índice de Ramfjord. Las mediciones se realizaron también en las cuatro superficies del diente: vestibular, palatino/lingual, mesial y distal, y con una sonda periodontal.

**Tabla 7:** Distintos valores del índice de hemorragia simplificado (128).

<b>Grado</b>	<b>Características</b>
0	No hay sangrado al sondaje (esperar 10 segundos).
1	Hay sangrado al sondaje (esperar 10 segundos).

El índice de hemorragia simplificado sólo se realiza en los dientes permanentes presentes en boca, de no estar presentes no se reemplazan por ningún otro diente. El promedio se hizo sumando los valores obtenidos y divididos por la cantidad de superficies medidas.

El índice de placa, el índice gingival y el índice de hemorragia fueron siempre llevados a cabo por el mismo examinador, en este caso por el investigador principal para así evitar discrepancias en los resultados.

## **5. Estrategia de análisis**

### **Análisis descriptivo**

Se realizó un análisis descriptivo de las diferentes variables seleccionadas, según su naturaleza cuantitativa o cualitativa:

*Variables cuantitativas:* medidas de tendencia central (media o mediana según la distribución gaussiana o no de la variable) y de dispersión (desviación estándar [DE] o intervalo intercuartílico [IQR] acompañando a la media y mediana respectivamente).

*Variables cualitativas:* expresadas como frecuencias absolutas y relativas (porcentajes).

**Análisis inferencial**

La posible *asociación o impacto de la toma de probióticos sobre los diferentes indicadores bucodentales* se realizó mediante una prueba de Análisis de la Covarianza (ANCOVA). Los resultados se expresaron como el nivel de cambio de la variable resultado respecto a los niveles basales.

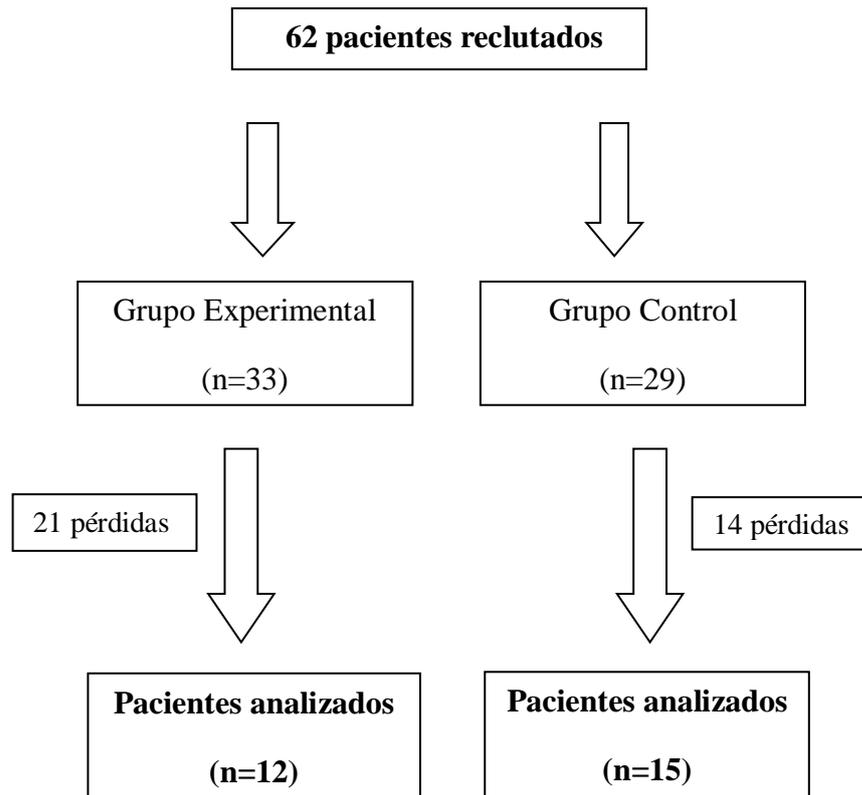
Las relaciones entre variables cualitativas se estimaron con Pruebas de Ji cuadrado (Test exacto de Fisher si los efectivos esperados eran inferiores a 5).

El nivel de significación utilizado para los contrastes fue un 5% ( $p < 0,05$ ).

Todos los cálculos se realizaron con el paquete estadístico PASW 18.0 (SPSS Inc).

# **RESULTADOS**

De un total de 418 escolares que asistían al Colegio Escolapias de Gandía (Valencia) se reclutaron 62, asignándose 33 al grupo experimental y 29 al grupo control. Finalmente, y por diferentes motivos, la muestra final de estudio quedó establecida con 12 casos en el grupo experimental y 15 en el grupo control (*Figura 7*).



**Figura 7.** Flujograma de participantes en el estudio experimental.

Ambos grupos fueron similares en cuanto a la distribución de edad y sexo y en relación a los parámetros bucodentales basales (*Tabla 8a*). Las características basales fueron similares y equiparables tanto en los sujetos que iniciaron el estudio como en los que fueron monitorizados durante todo el seguimiento (*Tabla 8b*).

**Tabla 8a.** Características basales de los grupos de estudio.

	<b>Grupo experimental (n=33)</b>	<b>Grupo placebo (n=29)</b>	<b>p</b>
<b>Sexo</b>			0,67
Niños	13 (39,4%)	13 (44,8%)	
Niñas	20 (60,6%)	16 (55,2%)	
<b>Edad</b>	13,8±1,8	13,8±2,0	0,99
<b>Índice de placa de Silness y Løe.</b>	0,67±0,44	0,67±0,43	0,97
<b>Índice gingival de Silness y Løe.</b>	0,52±0,36	0,36±0,33	0,07
<b>Índice de hemorragia</b>	0,04±0,05	0,05±0,07	0,53
<b>pH</b>	7,23±0,17	7,25±0,21	0,76
<b><i>Streptococcus mutans</i> (saliva)</b>			
< 10 <sup>4</sup>	8 (24,2%)	8 (27,6%)	0,85
10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	10 (30,3%)	11 (37,9%)	
10 <sup>5</sup> - 10 <sup>6</sup>	9 (27,3%)	6 (20,7%)	
> 10 <sup>6</sup>	6 (18,2%)	4 (13,8%)	
<b><i>Streptococcus mutans</i> (placa)</b>			
< 10 <sup>4</sup>	10 (60,6%)	18 (62,1%)	0,40
10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	11 (33,3%)	11 (62,1%)	
10 <sup>5</sup> - 10 <sup>6</sup>	2 (6,1%)	--	
<b><i>Lactobacillus sp.</i></b>	3,70±0,81	3,38±0,73	0,11

**Tabla 8b.** Características basales de los grupos de estudio (sujetos con todos los valores de seguimiento).

	Grupo experimental (n=12)	Grupo placebo (n=15)	p
<b>Sexo</b>			0,93
Niños	5 (41,7%)	6 (40%)	
Niñas	7 (58,3%)	9 (60%)	
<b>Edad</b>	13,3±1,5	13,6±1,6	0,57
<b>Índice de placa de Silness y Løe.</b>	0,73±0,44	0,64±0,45	0,61
<b>Índice gingival de Silness y Løe</b>	0,58±0,31	0,33±0,28	0,04
<b>Índice de hemorragia</b>	0,04±0,06	0,06±0,09	0,47
<b>pH</b>	7,28±0,20	7,27±0,23	0,87
<b><i>Streptococcus mutans</i> (saliva)</b>			
< 10 <sup>4</sup>	3 (25%)	3 (20%)	0,97
10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	5 (41,7%)	6 (40%)	
10 <sup>5</sup> - 10 <sup>6</sup>	3 (25%)	4 (26,7%)	
> 10 <sup>6</sup>	1 (8,3%)	2 (13,3%)	
<b><i>Streptococcus mutans</i> (placa)</b>			
< 10 <sup>4</sup>	8 (66,7%)	9 (60%)	0,72
10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	4 (33,3%)	6 (40%)	
10 <sup>5</sup> - 10 <sup>6</sup>	--	--	
<b><i>Lactobacillus sp.</i></b>	3,58±0,67	3,53±0,83	0,88

## 1. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LOS PROBIÓTICOS SOBRE LOS ÍNDICES DE SALUD BUCODENTAL

A continuación se presentan varias tablas (*Tablas 9-15*) y figuras (*Figuras 8-14*) donde queda resumido el efecto de los probióticos sobre los diferentes indicadores bucodentales analizados.

### 1.1 Análisis del efecto longitudinal del empleo de probióticos sobre el índice de placa

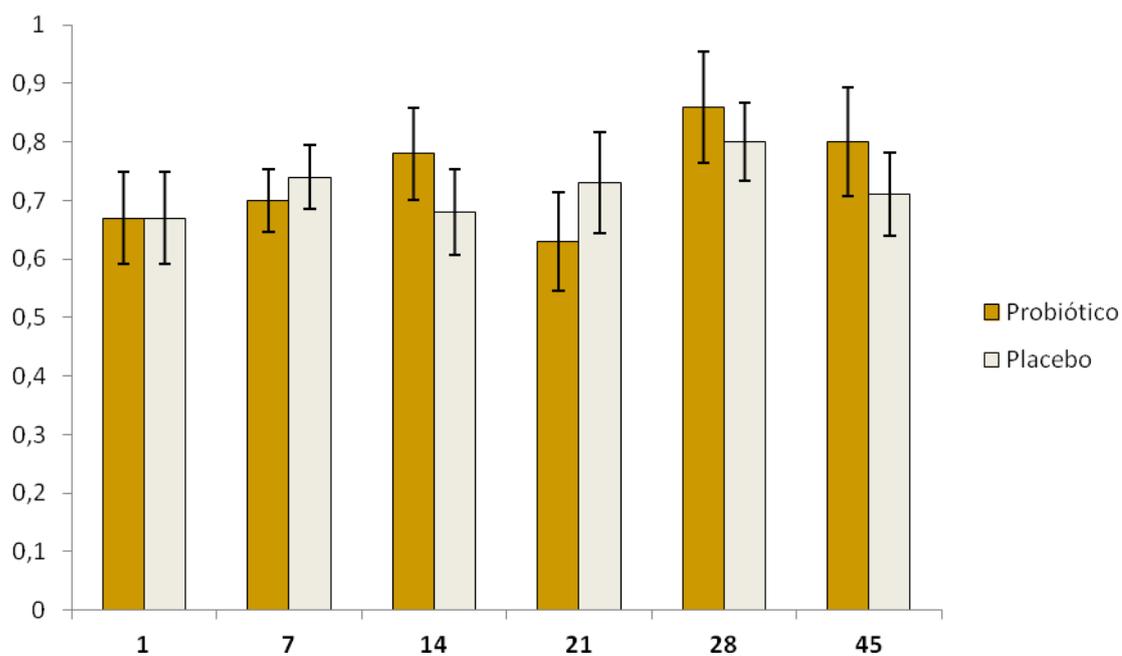
Al analizar el *índice de placa* comparando la diferencia de cambios entre ambos grupos, estimada sobre el nivel basal del indicador, observamos un efecto inicialmente favorable (negativo) que después se estabiliza (*Tabla 9; Figura 8*), aunque la diferencia entre ambos grupos no fue estadísticamente significativa.

**Tabla 9.** Análisis del efecto longitudinal del empleo de probióticos sobre el índice de placa.

Día del estudio	Probiótico	Placebo	Efecto (EE)	p
1	0,67±0,44	0,67±0,43	--	
7	0,70±0,29	0,74±0,30	-0,035 (0,071)	0,62
14	0,78±0,39	0,68±0,35	0,114 (0,096)	0,24
21	0,63±0,35	0,73±0,34	-0,070 (0,100)	0,49
28	0,86±0,36	0,80±0,26	0,035 (0,106)	0,74
45	0,80±0,32	0,71±0,27	0,067 (0,103)	0,52

*Efecto: diferencia entre ambos grupos estimada sobre el nivel basal del indicador*

*EE: error estándar*

**Figura 8.** Cambios en el índice de placa a lo largo del estudio en ambos grupos.

## 1.2 Análisis del efecto longitudinal del empleo de probióticos sobre el índice gingival

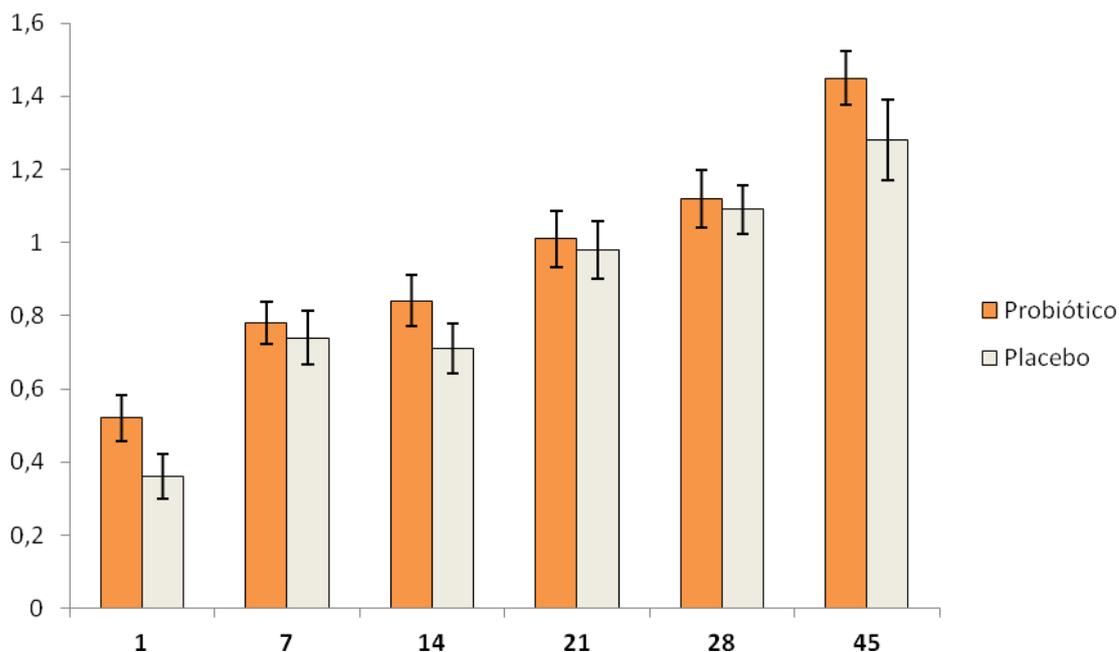
En el estudio del *índice gingival* el efecto del probiótico se mantiene favorable (efecto de signo negativo) prácticamente hasta el final del seguimiento (*Tabla 10; Figura 9*). Estos resultados indican que en el grupo experimental este índice tuvo un crecimiento más lento si lo comparamos con el grupo control, pero sin ser estas diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla 10.** Análisis del efecto de empleo de probióticos sobre el índice gingival.

Día del estudio	Probiótico	Placebo	Efecto (EE)	p
1	0,52±0,36	0,36±0,33	--	
7	0,78±0,33	0,74±0,40	-0,046 (0,084)	0,59
14	0,84±0,34	0,71±0,32	0,058 (0,100)	0,56
21	1,01±0,31	0,98±0,31	-0,026 (0,111)	0,82
28	1,12±0,29	1,09±0,26	-0,061 (0,099)	0,54
45	1,45±0,26	1,28±0,39	0,065 (0,139)	0,64

*Efecto: diferencia entre ambos grupos estimada sobre el nivel basal del indicador*

*EE: error estándar*



**Figura 9.** Cambios en el índice gingival a lo largo del estudio en ambos grupos.

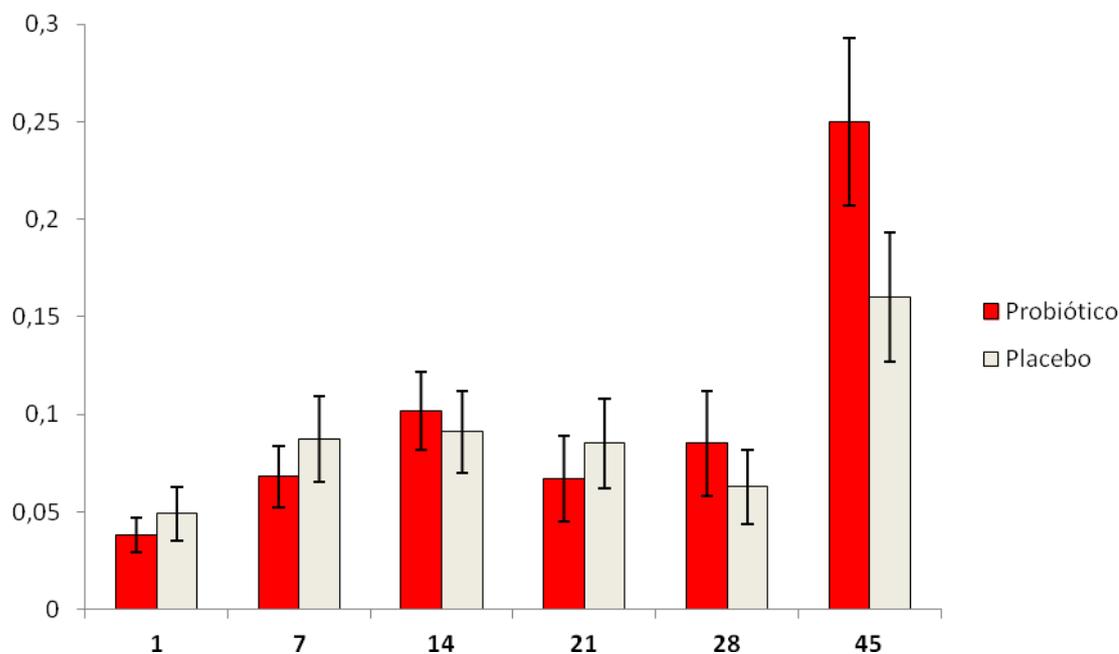
### 1.3 Análisis del efecto longitudinal del empleo de probióticos sobre el índice de hemorragia

El *índice de hemorragia* se asocia favorablemente con el uso de probiótico en una magnitud y tiempos similares al índice de placa (*Tabla 11; Figura 10*). En la *tabla 11* los resultados nos muestran como el índice de hemorragia aumenta en ambos grupos, sin embargo en el grupo probiótico el crecimiento es más lento. También podemos observar en la *Figura 10* el *efecto rebote* sufrido del día 28 al 45, donde se refleja un marcado ascenso del índice de hemorragia una vez los participantes dejaron de tomar tanto el probiótico como el placebo.

**Tabla 11.** Análisis del efecto de empleo de probióticos sobre el índice de hemorragia.

Día del estudio	Probiótico	Placebo	Efecto (EE)	p
1	0,04±0,05	0,05±0,07	--	
7	0,068±0,088	0,087±0,12	-0,013 (0,025)	0,61
14	0,102±0,096	0,091±0,099	0,022 (0,027)	0,41
21	0,067±0,089	0,085±0,091	-0,011 (0,032)	0,74
28	0,085±0,099	0,063±0,077	0,028 (0,032)	0,39
45	0,255±0,149	0,157±0,126	0,105 (0,54)	0,06

*Efecto: diferencia entre ambos grupos estimada sobre el nivel basal del indicador*  
*EE: error estándar*



**Figura 10.** Cambios en el índice de hemorragia a lo largo del estudio en ambos grupos.

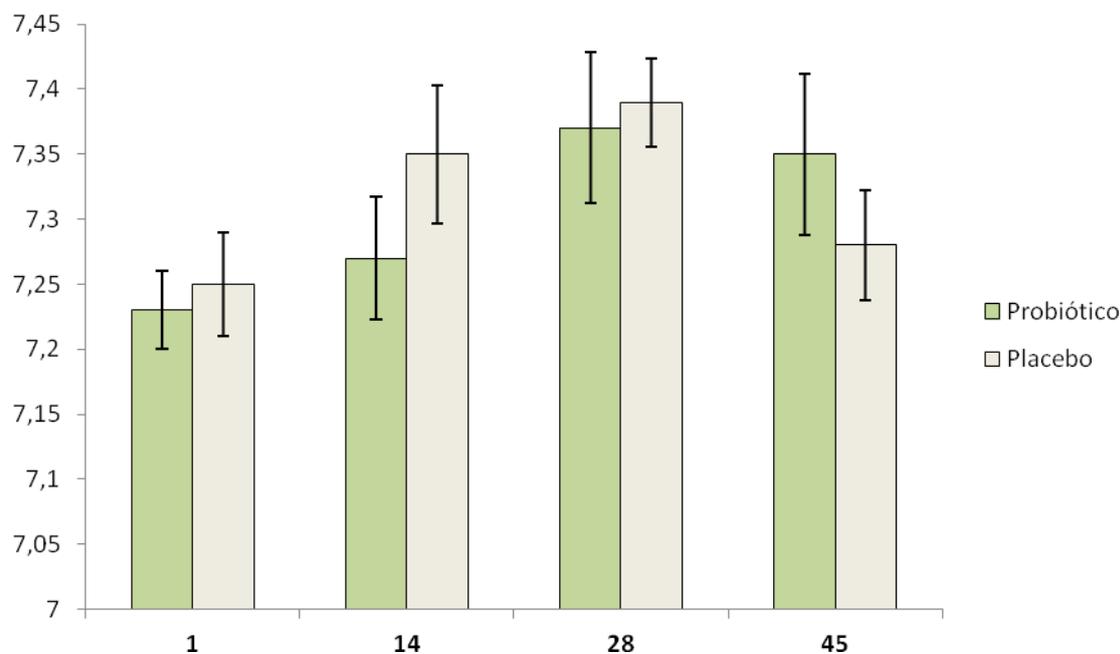
#### 1.4 Análisis del efecto longitudinal del empleo de probióticos sobre el pH

En el análisis de los cambios acontecidos sobre el *pH* se observa un descenso entre 3 y 4 centésimas en los niños consumidores de comprimidos probiótico respecto a los niños que consumieron comprimidos placebo, con un pequeño *efecto rebote* al final (*Tabla 12; Figura 11*). Los resultados nos muestran un ascenso más lento del valor de pH en el grupo experimental respecto al grupo control durante el periodo de intervención, pero se produce un descenso menos acusado en el grupo experimental respecto al grupo control transcurridos los 17 días de tratamiento.

**Tabla 12.** Análisis del efecto del empleo de probióticos sobre el pH.

Día del estudio	Probiótico	Placebo	Efecto (EE)	p
1	7,23±0,17	7,25±0,21	--	
14	7,27±0,23	7,35±0,25	-0,040 (0,038)	0,29
28	7,37±0,22	7,39±0,14	-0,026 (0,056)	0,64
45	7,35±0,21	7,28±0,16	0,061 (0,060)	0,31

*Efecto: diferencia entre ambos grupos estimada sobre el nivel basal del indicador*  
*EE: error estándar*



**Figura 11.** Cambios en el pH a lo largo del estudio en ambos grupos.

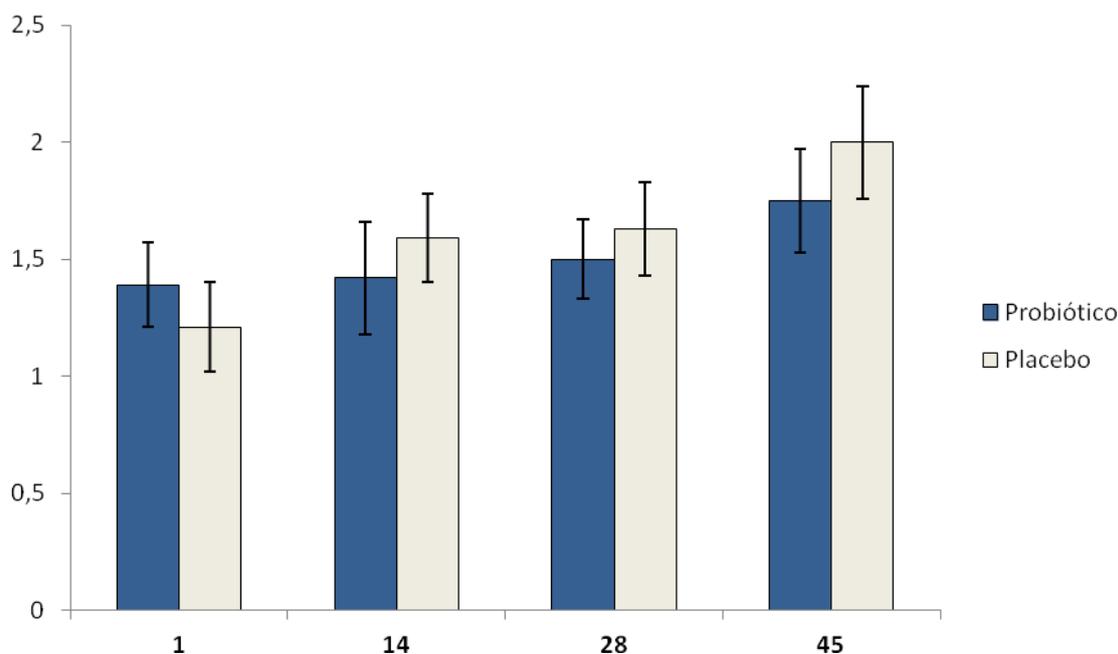
### 1.5 Análisis del efecto longitudinal del empleo de probióticos sobre los niveles de *S. mutans* en placa y saliva

El tratamiento con comprimidos de probiótico se asocia a un enlentecimiento en el **crecimiento de *S. mutans*** tanto en saliva como en placa, mantenido a lo largo del seguimiento, como se presenta en las *Tablas 13 y 14* y las *Figuras 12 y 13* respectivamente. Podemos observar en las *Figuras 12 y 13* que al comparar el crecimiento de *S. mutans* en ambos grupos de estudio el crecimiento de esta especie bacteriana es menor, sin ser estadísticamente significativo.

**Tabla 13.** Análisis del efecto de empleo de probióticos sobre los niveles de *S. mutans* en saliva.

Día del estudio	Probiótico	Placebo	Efecto (EE)	p
1	1,39±0,64	1,21±0,80	--	
14	1,42±1,18	1,59±0,91	-0,20 (0,291)	0,49
28	1,50±0,65	1,63±0,81	-0,059 (0,239)	0,82
45	1,75±0,75	2,00±0,93	-0,188 (0,309)	0,55

*Efecto: diferencia entre ambos grupos estimada sobre el nivel basal del indicador*  
*EE: error estándar*



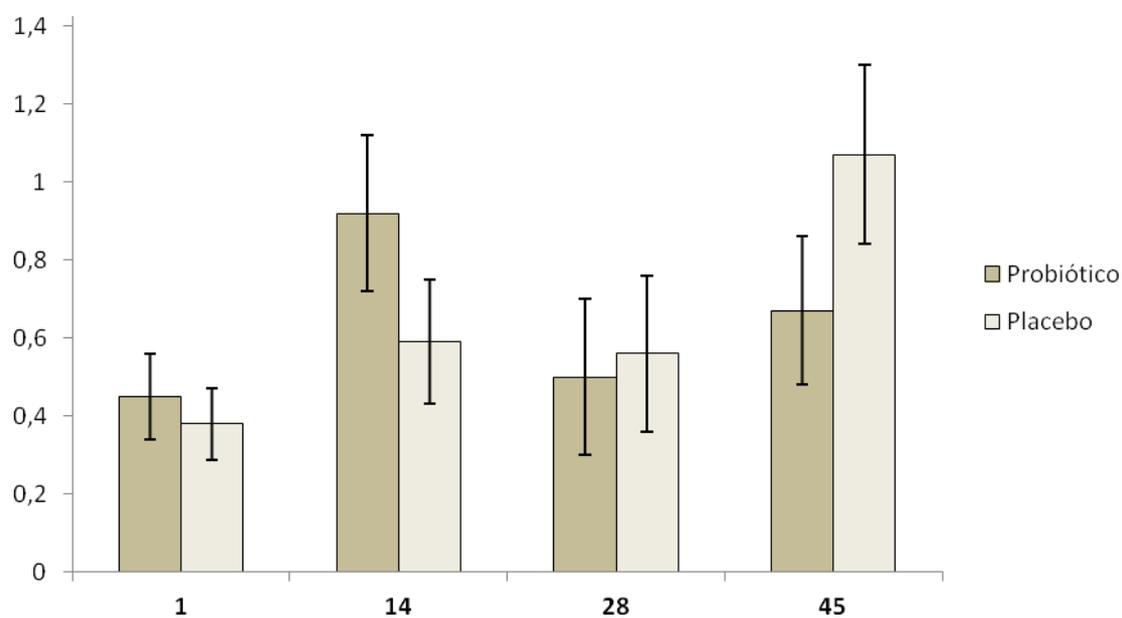
**Figura 12.** Cambios en los niveles de *S. mutans* en saliva a lo largo del estudio en ambos grupos.

**Tabla 14.** Análisis del efecto de empleo de probióticos sobre los niveles de *S. mutans* en placa.

Día del estudio	Probiótico	Placebo	Efecto (EE)	p
1	0,45±0,38	0,38±0,35	--	
14	0,92±0,97	0,50±0,73	0,310 (0,259)	0,24
28	0,50±0,76	0,56±0,81	-0,057 (0,289)	0,85
45	0,67±0,65	1,97±0,88	-0,401 (0,313)	0,21

*Efecto: diferencia entre ambos grupos estimada sobre el nivel basal del indicador*

*EE: error estándar*

**Figura 13.** Cambios en los niveles de *S. mutans* en placa a lo largo del estudio en ambos grupos.

### 1.6 Análisis del efecto longitudinal del empleo de probióticos sobre los niveles de lactobacilos *en saliva*

Por otro lado, el probiótico se asocia a un mantenimiento de los niveles de *Lactobacillus sp.* (efecto positivo por un descenso menos marcado) en los tres puntos de seguimiento, como se observa en la *Tabla 15* y la *Figura 14*). Como nos muestran los resultados, se produce un descenso en ambos grupos, aunque sin ser esta diferencia estadísticamente significativa.

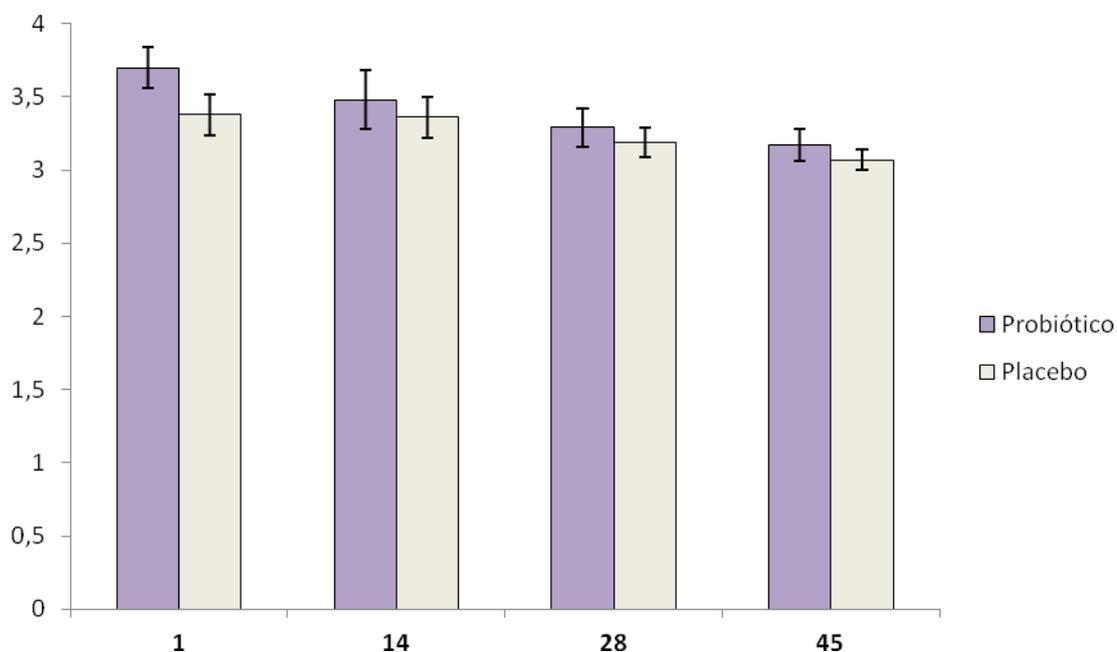
**Tabla 15.** Análisis del efecto de empleo de probióticos sobre los niveles de *Lactobacillus sp.*

Día del estudio	Probiótico	Placebo	Efecto (EE)	p
1	3,70±0,48	3,38±0,47	--	
14	3,48±0,95	3,36±0,66	0,013 (0,237)	0,96
28	3,29±0,47	3,19±0,40	0,091 (0,162)	0,58
45	3,17±0,39	3,07±0,26	0,099 (0,127)	0,44

*Niveles transformados (logaritmo natural)*

*Efecto: diferencia entre ambos grupos estimada sobre el nivel basal del indicador*

*EE: error estándar*



**Figura 14.** Cambios en los niveles de *Lactobacillus sp.* a lo largo del estudio en ambos grupos.

---

## 2. ESTUDIO DE LOS HÁBITOS DIETÉTICOS E HIGIÉNICOS POR MEDIO DE UNA ENCUESTA

### 2.1 Estudio de hábitos dietéticos

A continuación en la *Tabla 16*, se detallan los datos recogidos sobre el estudio de hábitos alimenticios tras realizar la encuesta. Al analizar estos resultados podemos deducir de forma general que el consumo de alimentos saludables es frecuente, sobre todo de lácteos. Sin embargo, en el momento del desayuno los alimentos consumidos no son lo más recomendables, dato que contrasta con el almuerzo, donde los encuestados contestan que comen más un bocadillo que bollería. Se destaca que el porcentaje de participantes que consume *comida basura* sigue siendo elevado.

**Tabla 16.** Encuesta sobre salud bucodental. Preguntas sobre hábitos alimenticios.

Pregunta	Respuestas	N (%)
<i>¿Picas entre horas?</i>	No	12 (44,4%)
	Sí	15 (55,6%)
<i>¿Bebes refrescos a diario, tipo coca-cola, fanta, trinaranjus, acuarius...?</i>	No	21 (77,8%)
	Sí	6 (22,2%)
<i>¿Tomas alimentos de consistencia pegajosa (p. ej. gominolas)?</i>	No	18 (66,7%)
	Sí	9 (33,3%)
<i>¿Con qué frecuencia comes golosinas?</i>	Nunca	13 (48,1%)
	1 – 2 veces por semana	14 (51,9%)
<i>¿Con qué frecuencia comes pescado?</i>	Nunca	4 (14,8%)
	1 – 2 veces a la semana	19 (70,4%)
	3 ó más veces a la semana	4 (14,8%)
<i>¿Con qué frecuencia comes fruta?</i>	Nunca	3 (11,1%)
	1 – 2 veces a la semana	5 (18,5%)
	Todos los días	19 (70,4%)
<i>¿Con qué frecuencia comes verduras?</i>	Nunca	3 (11,1%)
	1 – 2 veces a la semana	10 (37,0%)
	Todos los días	14 (51,9%)
<i>¿Sueles acompañar las comidas con ketchup, mayonesa u otro tipo de salsa?</i>	No	16 (59,3%)
	Sí	11 (40,7%)
<i>¿Con qué frecuencia comes patatas fritas?</i>	Nunca	8 (29,6%)
	1– 2 veces a la semana	16 (59,3%)
	Más de 3 veces a a la semana	3 (11,1%)

<i>¿Sueles comer comida a la plancha?</i>	No	5 (18,5%)
	Sí	22 (81,5%)
<b>¿Sueles comer comida frita o rebozada?</b>	No	16 (59,3%)
	Sí	11 (40,7%)
<i>¿Con qué frecuencia tomas lácteos (yogures, actimel o similares)?</i>	1 – 2 veces a la semana	8 (29,6%)
	Todos los días	19 (70,4%)
<b>¿Sueles desayunar leche con Cola-Cao o similares y bollería?</b>	No	8 (29,6%)
	Sí	19 (70,4%)
<i>¿Desayunas tostadas con mermelada y mantequilla?</i>	No	4 (14,8%)
	Sí	23 (85,2%)
<b>¿Desayunas leche con cereales?</b>	No	15 (55,6%)
	Sí	12 (44,4%)
<i>¿Desayunas una tostada con aceite?</i>	No	21 (77,8%)
	Sí	6 (22,2%)
<i>¿Con qué frecuencia bebes zumo?</i>	Nunca	14 (51,9%)
	1 – 2 veces a la semana	5 (18,5%)
	Más de 3 veces a la semana	8 (29,6%)
<b>¿Meriendas bollería?</b>	No	24 (88,9%)
	Sí	3 (11,1%)
<b>¿Almuerzas (a media mañana) un bocata?</b>	No	4 (14,8%)
	Sí	23 (85,2%)
<b>¿Almuerzas (a media mañana) bollería?</b>	No	26 (96,3%)
	Sí	1 (3,7%)
<b>¿Meriendas un bocata?</b>	No	19 (70,4%)
	Sí	8 (29,6%)
<i>¿Con qué frecuencia comes “comida basura”?</i>	Nunca	11 (40,7%)
	1 – 2 veces a la semana	14 (51,9%)
	Más de 3 veces a la semana	2 (7,4%)

## 2.2 Estudio de hábitos de higiene bucodental

En la *Tabla 17* se muestra el cuestionario sobre hábitos de higiene bucodental que respondieron los participantes del estudio. En ella, los resultados obtenidos a nivel general nos muestran que los participantes de este estudio acuden con regularidad a su cita con el odontólogo y presentan adecuados hábitos de higiene bucodental, a excepción del uso de la seda dental y los enjuagues con flúor.

**Tabla 17.** Encuesta sobre salud bucodental. Preguntas sobre higiene bucodental.

Pregunta	Respuestas	N (%)
<i>¿Te cepillas los dientes después de todas las comidas?</i>	No	11 (40,7%)
	Sí	16 (59,3%)
<i>¿Utilizas enjuagues con flúor?</i>	No	17 (63,0%)
	Sí	10 (37,0%)
<i>¿Utilizas la seda dental?</i>	No	21 (77,8%)
	Sí	6 (22,2%)
<i>¿Te sangran las encías cuando te cepillas los dientes?</i>	No	22 (81,5%)
	Sí	5 (18,5%)
<i>¿Con qué frecuencia te cepillas los dientes?</i>	1 vez al día	8 (29,6%)
	2 ó 3 veces al día	19 (70,4%)
<i>¿Visitas al dentista una ó más veces al año?</i>	No	6 (22,2%)
	Sí	21 (77,8%)
<i>¿Te han hecho alguna vez una limpieza bucal?</i>	No	1 (3,7%)
	Sí	26 (96,3%)
<i>¿Has tenido alguna vez una caries?</i>	No	12 (44,4%)
	Sí	15 (55,6%)
<i>¿Vas al dentista a que te haga una limpieza bucal una vez cada año o cada dos años?</i>	No	6 (22,2%)
	Sí	21 (77,8%)

### 3. RELACIÓN DE HÁBITOS DIETÉTICOS E HIGIÉNICOS CON INDICADORES DE SALUD BUCODENTAL

Al relacionar los resultados de la encuesta con los indicadores de salud bucodental, en general los hábitos dietéticos y de higiene bucodental mostraron un patrón de correlaciones débil con los índices de salud bucodental, como se observa en la *Tabla 18*. Sin embargo, se observó una correlación positiva y significativa entre la puntuación obtenida y el índice de placa, lo que conlleva que unos peores hábitos dietéticos y de higiene bucodental pueden asociarse a estas edades con un mayor crecimiento de la placa.

**Tabla 18.** Patrón de correlaciones no paramétricas entre los puntos obtenidos en la encuesta y los indicadores de salud bucodental.

	Total puntos	Puntos dieta	Puntos higiene
Índice de placa	0,384*	0,283	0,301
Índice de gingivitis	0,076	0,214	-0,260
Índice de hemorragia	-0,061	-0,061	-0,165
pH	0,152	0,173	0,235
<i>S. mutans</i> saliva	0,244	0,200	0,043
<i>S. mutans</i> placa	-0,020	-0,055	0,025
<i>Lactobacillus sp.</i>	-0,261	-0,287	-0,036
log10			

\* $p < 0,05$

### 4. RELACIÓN DE HÁBITOS DIETÉTICOS E HIGIÉNICOS CON INDICADORES DE SALUD BUCODENTAL SEGÚN SEXO Y EDAD

Al relacionar los hábitos dietéticos y de higiene bucodental por sexo, aunque las niñas tienden a tener una mayor puntuación en la escala que los niños ( $13,9 \pm 4,3$  vs.  $13,4 \pm 4,7$ ), las diferencias no alcanzaron la significación estadística. Por ítems, se observa en la *Tabla 19* que las niñas tienden a un mayor consumo de frutas y de alimentos ricos en azúcares. En la *Tabla 20*, también se observa que las niñas presentaron hábitos higiénicos algo peores que los de los niños.

Tabla 19. Preguntas sobre hábitos alimenticios. Distribución por sexo.

Pregunta	Respuestas	Niños	Niñas	p
<i>¿Picas entre horas?</i>	No	6 (60%)	6 (35,3%)	0,26
	Sí	4 (40%)	11 (64,7%)	
<i>¿Bebes refrescos a diario, tipo coca-cola, fanta, trinaranjus, acuarius...?</i>	No	8 (80%)	13 (76,5%)	>0,99
	Sí	2 (20%)	4 (23,5%)	
<i>¿Tomas alimentos de consistencia pegajosa (p. ej. gominolas)?</i>	No	9 (90%)	9 (52,9%)	0,09
	Sí	1 (10%)	8 (47,1%)	
<i>¿Con qué frecuencia comes golosinas?</i>	Nunca	7 (70%)	6 (35,3%)	0,12
	1 – 2 veces/semana	3 (30%)	11 (64,7%)	
<i>¿Con qué frecuencia comes pescado?</i>	Nunca	2 (20%)	2 (11,8%)	0,76
	1 – 2 veces/semana	7 (70%)	12 (70,6%)	
	3 ó más veces/sem.	1 (10%)	3 (17,6%)	
<i>¿Con qué frecuencia comes fruta?</i>	Nunca	3 (30%)	--	0,05
	1 – 2 veces/semana	1 (10%)	4 (23,5%)	
	Todos los días	6 (60%)	13 (76,5%)	
<i>¿Con qué frecuencia comes verduras?</i>	Nunca	1 (10%)	2 (11,8%)	0,56
	1 – 2 veces/semana	5 (50%)	5 (29,4%)	
	Todos los días	4 (40%)	10 (58,8%)	
<i>¿Sueles acompañar las comidas con ketchup, mayonesa u otro tipo de salsa?</i>	No	8 (80%)	8 (47,1%)	0,12
	Sí	2 (20%)	9 (52,9%)	
<i>¿Con qué frecuencia comes patatas fritas?</i>	Nunca	3 (30%)	5 (29,4%)	0,99
	1 – 2 veces/semana	6 (60%)	10 (58,8%)	
	Más de 3 veces/sem.	1 (10%)	2 (11,8%)	
<i>¿Sueles comer comida a la plancha?</i>	No	2 (20%)	3 (17,6%)	>0,99

	Sí	8 (80%)	14 (82,4%)	
<i>¿Sueles comer comida frita o rebozada?</i>	No	8 (80%)	8 (47,1%)	0,12
	Sí	2 (20%)	9 (52,9%)	
<i>¿Con qué frecuencia tomas lácteos (yogures, actimel o similares, queso...)?</i>	1 – 2 veces/semana	7 (70%)	12 (70,6%)	>0,99
	Todos los días	3 (30%)	5 (29,4%)	
<i>¿Sueles desayunar leche con Cola-Cao o similares y bollería?</i>	No	3 (30%)	5 (29,4%)	>0,99
	Sí	7 (70%)	12 (70,6%)	
<i>¿Desayunas tostadas con mermelada y mantequilla?</i>	No	8 (80%)	15 (88,2%)	0,61
	Sí	2 (20%)	2 (11,8%)	
<i>¿Desayunas leche con cereales?</i>	No	3 (30%)	9 (52,9%)	0,42
	Sí	7 (70%)	8 (47,1%)	
<i>¿Desayunas una tostada con aceite?</i>	No	3 (30%)	3 (17,6%)	0,64
	Sí	7 (70%)	14 (82,4%)	
<i>¿Con qué frecuencia bebes zumo?</i>	Nunca	3 (30%)	11 (64,7%)	0,21
	1 – 2 veces/semana	3 (30%)	2 (11,8%)	
	Más de 3 veces/sem.	4 (40%)	4 (23,5%)	
<i>¿Meriendas bollería?</i>	No	9 (90%)	15 (88,2%)	>0,99
	Sí	1 (10%)	2 (11,8%)	
<i>¿Almuerzas (a media mañana) un bocata?</i>	No	--	4 (23,5%)	0,26
	Sí	10 (100%)	13 (76,5%)	
<i>¿Almuerzas (a media mañana) bollería?</i>	No	10 (100%)	16 (94,1%)	>0,99
	Sí	--	1 (5,9%)	
<i>¿Meriendas un bocata?</i>	No	6 (60%)	13 (76,5%)	0,42
	Sí	4 (40%)	4 (23,5%)	
<i>¿Con qué frecuencia comes “comida basura”?</i>	Nunca	6 (60%)	5 (29,4%)	0,22
	1 – 2 veces/semana	3 (30%)	11 (64,7%)	
	Más de 3 veces/sem.	1 (10%)	1 (5,9%)	

Tabla 20. Preguntas sobre higiene bucodental. Distribución por sexo.

Pregunta	Respuestas	Niños	Niñas	p
<i>¿Te cepillas los dientes después de todas las comidas?</i>	No	6 (60%)	5 (29,4%)	0,22
	Sí	4 (40%)	12 (70,6%)	
<i>¿Utilizas enjuagues con flúor?</i>	No	6 (60%)	11 (64,7%)	>0,99
	Sí	4 (40%)	6 (35,3%)	
<i>¿Utilizas la seda dental?</i>	No	8 (80%)	13 (76,5%)	>0,99
	Sí	2 (20%)	4 (23,5%)	
<i>¿Te sangran las encías cuando te cepillas los dientes?</i>	No	9 (90%)	13 (76,5%)	0,62
	Sí	1 (10%)	4 (23,5%)	
<i>¿Con qué frecuencia te cepillas los dientes?</i>	1 vez al día	5 (50%)	3 (17,6%)	0,10
	2 ó 3 veces/día	5 (50%)	14 (82,4%)	
<i>¿Visitas al dentista una ó más veces al año?</i>	No	--	6 (35,3%)	0,06
	Sí	10 (100%)	11 (64,7%)	
<i>¿Te han hecho alguna vez una limpieza bucal?</i>	No	--	1 (5,9%)	>0,99
	Sí	10 (100%)	16 (94,1%)	
<i>¿Has tenido alguna vez una caries?</i>	No	4 (40%)	8 (47,1%)	>0,99
	Sí	6 (60%)	9 (52,9%)	
<i>¿Vas al dentista a que te haga una limpieza bucal una vez cada año o cada dos años?</i>	No	--	6 (35,3%)	0,06
	Sí	10 (100%)	11 (64,7%)	

Al relacionar los hábitos dietéticos y de higiene bucodental por edad se observa que a una mayor edad la puntuación de la encuesta es menor, con una correlación negativa de la edad con los puntos totales ( $Rho=-0,287$ ;  $p=0,15$ ), los de la encuesta dietética ( $Rho=-0,263$ ;  $p=0,19$ ) y los de la higiene bucodental ( $Rho=-0,137$ ;  $p=0,50$ ). Por ítems, no se ven diferencias importantes entre los participantes por grupos de edad, salvo en la frecuencia del cepillado de dientes después de las comidas, como se observa en la *Tabla 22*.

Tabla 21. Preguntas sobre hábitos alimenticios. Distribución por grupos de edad.

Pregunta	Respuestas	< 14 años	≥ 14 años	p
<i>¿Picas entre horas?</i>	No	8 (44,4%)	4 (44,4%)	>0,99
	Sí	10 (55,6%)	5 (55,6%)	
<i>¿Bebes refrescos a diario, tipo coca-cola, fanta, trinaranjus, acuarius...?</i>	No	16 (88,9%)	5 (55,6%)	0,14
	Sí	2 (11,1%)	4 (44,4%)	
<i>¿Tomas alimentos de consistencia pegajosa (p. ej. gominolas)?</i>	No	12 (66,7%)	6 (66,7%)	>0,99
	Sí	6 (33,3%)	3 (33,3%)	
<i>¿Con qué frecuencia comes golosinas?</i>	Nunca	8 (44,4%)	5 (55,6%)	0,70
	1 – 2 veces/semana	10 (55,6%)	4 (44,4%)	
<i>¿Con qué frecuencia comes pescado?</i>	Nunca	3 (16,7%)	1 (11,1%)	0,16
	1 – 2 veces/semana	14 (77,8%)	5 (55,6%)	
	3 ó más veces/sem.	1 (5,6%)	3 (33,3%)	
<i>¿Con qué frecuencia comes fruta?</i>	Nunca	2 (11,1%)	1 (11,1%)	0,21
	1 – 2 veces/semana	5 (27,8%)	--	
	Todos los días	11 (61,1%)	8 (88,9%)	
<i>¿Con qué frecuencia comes verduras?</i>	Nunca	2 (11,1%)	1 (11,1%)	0,50
	1 – 2 veces/semana	8 (44,4%)	2 (22,2%)	
	Todos los días	8 (44,4%)	6 (66,7%)	
<i>¿Sueles acompañar las comidas con ketchup, mayonesa u otro tipo de salsa?</i>	No	11 (61,1%)	5 (55,6%)	0,78
	Sí	7 (38,9%)	4 (44,4%)	
<i>¿Con qué frecuencia comes patatas fritas?</i>	Nunca	6 (33,3%)	2 (22,2%)	0,83
	1 – 2 veces/semana	10 (55,6%)	6 (66,7%)	
	Más de 3 veces/sem.	2 (11,2%)	1 (11,1%)	
<i>¿Sueles comer comida a la plancha?</i>	No	14 (77,8%)	8 (88,9%)	0,48
	Sí	4 (22,2%)	1 (11,1%)	

<i>¿Sueles comer comida frita o rebozada?</i>	No	11 (61,1%)	5 (55,6%)	0,78
	Sí	7 (38,9%)	4 (44,4%)	
<i>¿Con qué frecuencia tomas lácteos (yogures, actimel o similares, queso...)?</i>	1 – 2 veces/semana	6 (33,3%)	2 (22,2%)	0,68
	Todos los días	12 (66,7%)	7 (77,8%)	
<i>¿Sueles desayunar leche con Cola-Cao o similares y bollería?</i>	No	3 (16,7%)	5 (55,6%)	0,07
	Sí	15 (83,3%)	4 (44,4%)	
<i>¿Desayunas tostadas con mermelada y mantequilla?</i>	No	15 (83,3%)	8 (88,9%)	>0,99
	Sí	3 (16,7%)	1 (11,1%)	
<i>¿Desayunas leche con cereales?</i>	No	12 (66,7%)	3 (33,3%)	0,13
	Sí	6 (33,3%)	6 (66,7%)	
<i>¿Desayunas una tostada con aceite?</i>	No	13 (82,2%)	8 (88,9%)	0,63
	Sí	5 (27,8%)	1 (11,1%)	
<i>¿Con qué frecuencia bebes zumo?</i>	Nunca	9 (50,0%)	5 (55,6%)	0,83
	1 – 2 veces/semana	3 (16,7%)	2 (22,2%)	
	Más de 3 veces/sem.	6 (33,3%)	2 (22,2%)	
<i>¿Meriendas bollería?</i>	No	15 (83,3%)	9 (100%)	0,53
	Sí	3 (16,7%)	--	
<i>¿Almuerzas (a media mañana) un bocata?</i>	No	1 (5,6%)	3 (33,3%)	0,09
	Sí	17 (94,4%)	6 (66,7%)	
<i>¿Almuerzas (a media mañana) bollería?</i>	No	18 (100%)	8 (88,9%)	0,33
	Sí	--	1 (11,1%)	
<i>¿Meriendas un bocata?</i>	No	12 (66,7%)	7 (77,8%)	0,68
	Sí	6 (33,3%)	2 (22,2%)	
<i>¿Con qué frecuencia comes “comida basura”?</i>	Nunca	8 (44,4%)	3 (33,3%)	0,42
	1 – 2 veces/semana	8 (44,4%)	6 (66,7%)	
	Más de 3 veces/sem.	2 (11,1%)	--	

Tabla 22. Preguntas sobre higiene bucodental. Distribución por grupo de edad.

Pregunta	Respuestas	< 14 años	≥ 14 años	p
<i>¿Te cepillas los dientes después de todas las comidas?</i>	No	10 (55,6%)	1 (11,1%)	0,042
	Sí	8 (44,4%)	8 (88,9%)	
<i>¿Utilizas enjuagues con flúor?</i>	No	11 (61,1%)	6 (66,7%)	>0,99
	Sí	7 (38,9%)	3 (33,3%)	
<i>¿Utilizas la seda dental?</i>	No	13 (72,2%)	8 (88,9%)	0,33
	Sí	5 (27,8%)	1 (11,1%)	
<i>¿Te sangran las encías cuando te cepillas los dientes?</i>	No	13 (72,2%)	9 (100%)	0,14
	Sí	5 (27,8%)	--	
<i>¿Con qué frecuencia te cepillas los dientes?</i>	1 vez al día	7 (38,9%)	1 (11,1%)	0,20
	2 ó 3 veces/día	11 (61,1%)	8 (88,9%)	
<i>¿Visitas al dentista una ó más veces al año?</i>	No	4 (22,2%)	2 (22,2%)	>0,99
	Sí	14 (77,8%)	7 (77,8%)	
<i>¿Te han hecho alguna vez una limpieza bucal?</i>	No	1 (5,6%)	--	>0,99
	Sí	17 (94,4%)	9 (100%)	
<i>¿Has tenido alguna vez una caries?</i>	No	9 (50%)	3 (33,3%)	0,68
	Sí	9 (50%)	6 (66,7%)	
<i>¿Vas al dentista a que te haga una limpieza bucal una vez cada año o cada dos años?</i>	No	4 (22,2%)	2 (22,2%)	>0,99
	Sí	14 (77,8%)	7 (77,8%)	

# **DISCUSIÓN**

La caries dental es una de las enfermedades más comunes y prevenibles que existe en la actualidad. Hoy en día las estrategias preventivas de la caries dental están encaminadas a modificar cualquiera de los factores implicados en la misma: control del factor huésped, modificación del sustrato y control mecánico y químico de la placa dental (26). Para que un producto probiótico tenga un efecto beneficioso en cuanto a la prevención de la caries debe ser capaz de adherirse a las superficies dentales e integrarse en las comunidades bacterianas, formando así parte del biofilm dental (38).

En los últimos años la investigación sobre el uso de los probióticos en la prevención de las enfermedades de la caries dental y periodontal ha progresado considerablemente, lográndose avances en la caracterización de cepas probióticas concretas, en las cantidades y frecuencia de administración necesarias para obtener un efecto beneficioso, en su relación con ciertas patologías y en la seguridad en su consumo (38). Este hecho justifica el importante esfuerzo que viene realizando la comunidad científica para la búsqueda de nuevas terapias que combinen eficacia con un adecuado margen de seguridad y ausencia de reacciones adversas. Sin embargo, aún no existen resultados concluyentes que nos determinen la cantidad, frecuencia y el tiempo que el sujeto debe estar tomando el probiótico para que éste tenga un efecto beneficioso.

En el análisis descriptivo del impacto de la toma de probióticos sobre los diferentes indicadores bucodentales partimos de dos grupos de estudio con similares características basales en todos los parámetros estudiados. Se pudo observar que el *índice de placa* en el grupo que tomó el probiótico era más bajo en comparación con el grupo placebo, es decir, se observó una tendencia en la obtención de un efecto beneficioso en el grupo experimental frente al grupo control, aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos. Otra de las variables estudiadas fue el *índice de gingivitis*. El efecto del uso del probiótico fue beneficioso en comparación con el grupo de escolares que recibió comprimidos placebo, sin que esta diferencia resultase estadísticamente significativa. Un hecho que también pudimos observar es que una vez los escolares dejaron de tomar los comprimidos de probiótico o de placebo hubo un *efecto rebote* en ambos grupos. Esto se traduce en que, 17 días después de haber tomado el último comprimido, en ambos grupos hubo un empeoramiento en su salud gingival, hecho que pudo ser debido a que una vez dejaron de tomar el comprimido, ya fuese probiótico o placebo, los participantes dejaron de llevar una higiene dental tan exhaustiva como durante el periodo de intervención. En cuanto al análisis del *índice de hemorragia*, los resultados son poco significativos, ya que el efecto que tuvo el probiótico en este índice fue variable. No se ha podido concluir que hubiese una mejoría en el sangrado gingival en el grupo que tomó el probiótico. Al igual que en el índice gingival se observó un *efecto rebote* claramente importante, pudiendo ser debido a la falta de motivación en continuar con una higiene exhaustiva de los participantes. En el análisis de la *variable pH* se observó un aumento del pH en el grupo que tomó probiótico, pero no pudimos determinar una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

Destacamos en el análisis de esta variable el descenso del pH en ambos grupos 20 días después de haber tomado los comprimidos de probiótico o de placebo, hecho que también pudo ser determinado por la desmotivación de los alumnos en la higiene dental una vez hubo terminado el periodo de intervención.

Entre los factores etiológicos que influyen en el desarrollo de la caries dental destacamos el *factor microorganismo* como factor crucial en el desarrollo de la caries. En este estudio se ha analizado el efecto de los probióticos sobre dos de los patógenos más influyentes como agentes causales en el desarrollo de la caries: *S. mutans* y *Lactobacillus sp.* Se analizó el efecto de los probióticos sobre *S. mutans* presente en saliva y placa. Al analizar *S. mutans* en saliva, se observó una estabilidad de los niveles de éstos en el grupo experimental frente al grupo control. Es decir, su crecimiento fue más lento en el grupo experimental, lo que se traduce en que hubo un efecto beneficioso del probiótico sobre *S. mutans* recogido en saliva. Es importante señalar que una vez el grupo experimental dejó de tomar el probiótico el efecto beneficioso del mismo se mantuvo 17 días después. En el estudio del efecto del probiótico sobre *S. mutans* en placa, por el contrario, no se obtuvo ningún resultado concluyente. La mayoría de los estudios revisados no estudian el efecto del probiótico sobre *S. mutans* en placa debido a la dificultad del cultivo de estas bacterias en la placa. El recuento de *S. mutans* suele hacerse utilizando saliva porque se trata de estimar la probabilidad de desarrollar caries. Por último, el probiótico se asocia a un mantenimiento de los niveles de *Lactobacillus sp.*, es decir, se produce un descenso menos marcado de los niveles de *Lactobacillus sp.* del grupo experimental respecto al grupo control, aunque sin resultados estadísticamente significativos si comparamos ambos grupos de estudio.

Como última línea de estudio, se analizó la relación entre los índices de salud bucodental anteriormente nombrados y los hábitos dietéticos y de higiene bucodental, recogidos mediante una encuesta, así como la relación entre los hábitos dietéticos y de higiene bucal y la edad y el sexo de los escolares. Se pudo observar que unos peores hábitos dietéticos y de higiene bucodental se asociaban con un mayor crecimiento de placa, siendo esta correlación positiva y significativa. Asimismo, observamos que las niñas tendían a un mayor consumo de frutas y un mayor consumo en alimentos ricos en azúcares. Las niñas presentaron unos hábitos higiénicos algo peores que los niños, añadido al hecho de que los niños visitaban con mayor regularidad al odontólogo que las niñas. Al relacionar la edad de los individuos con los hábitos alimenticios e higiénicos no se observan diferencias importantes, salvo en la frecuencia del cepillado tras las comidas. Los niños menos de 14 años se cepillan los dientes con menor frecuencia que los mayores de 14 años, presentando mayores niveles de sangrado las encías.

En nuestro estudio hemos podido constatar una mejora en los parámetros bucales estudiados en el grupo que tomó probiótico respecto al grupo que tomó placebo, utilizando como probiótico dos cepas combinadas de *L. reuteri DSM 17938* y el *ATCC PTA 5289*. Existe diversidad en cuanto al microorganismo utilizado como probiótico en los estudios previos realizados, aunque con un

denominador común; el consumo de productos que contienen probióticos reduce el número de *S. mutans* en saliva. Esta tendencia parece ser independiente del producto usado (38), aunque este efecto no ha sido observado en todos los estudios (110).

### ***Efectos de los probióticos en la salud gingival***

En nuestro estudio no hemos podido constatar cambios estadísticamente significativos en los parámetros gingivales entre el grupo experimental y el grupo control, al igual que en el estudio llevado a cabo por Sinkiewicz y cols. (74) e Iniesta y cols. (127). Sin embargo, hemos observado un *efecto rebote* en el análisis de este parámetro una vez cesada la administración del probiótico. A pesar del comportamiento similar entre nuestro estudio y el de Sinkiewicz y cols., conviene señalar que existe una diferencia entre ambos, y es la combinación de las cepas utilizadas. En el estudio de Sinkiewicz y cols. utilizaron *L. reuteri* ATCC 55730 y ATCC PTA 5289. Iniesta y cols. (127). utilizaron las dos mismas cepas que nosotros en su estudio, *L. reuteri* ATCC PTA 5289 y DSM 17938, aunque el planteamiento de su estudio fue diferente al nuestro. Contaron con una muestra de 40 alumnos de odontología con gingivitis con edades entre los 20 y 24 años. Se les dio un comprimido conteniendo el probiótico o el placebo durante 28 días. El objetivo del estudio era investigar los efectos de un probiótico administrado oralmente en la microbiota oral, para lo que midieron los índices de placa y de gingivitis y recogieron saliva no estimulada y placa subgingival para analizar mediante la técnica PCR la microbiota. En los resultados vieron que los índices de placa y de gingivitis se mantuvieron iguales en el grupo experimental y de control desde el principio hasta finalizar los 28 días del periodo de intervención. Respecto a los cambios microbiológicos pudieron observar una asociación entre el probiótico con una reducción del recuento total de bacterias en saliva y una reducción en el número de ciertos patógenos periodontales.

Shimauchi y cols. (123) y Mayanagi y cols. (122) estudiaron los efectos que el *L. salivarius* producía sobre parámetros periodontales, como son la profundidad de bolsa, el índice gingival, el índice de hemorragia y el índice de placa. En ambos estudios se observó una mejoría de la salud periodontal en pacientes fumadores. Resultados similares se observan en los estudios llevados a cabo por Krasse y cols. (101) y Vivekananda y cols. (102), donde mediante el empleo de *L. reuteri* también se produjo una mejoría en los parámetros anteriores mencionados en una población de individuos fumadores. Debemos tener en cuenta que estos estudios difieren del nuestro en la edad de la muestra.

### ***Efecto de los probióticos en la prevención de la caries***

En nuestro estudio hemos observado que el probiótico utilizado sí producía un efecto beneficioso en la prevención de la caries al observar un crecimiento más lento en los niveles de *S. mutans* en el grupo

experimental, aunque sin ser estadísticamente significativo. Por el contrario, no pudimos concluir el efecto beneficioso del probiótico en los niveles de *Lactobacillus sp.* Existen autores, como Glavina y cols. (93) y Ahola y cols. (109) que utilizaron como probiótico el *LGG*. Glavina y cols. administraron el probiótico con yogurt durante 14 días a una muestra de 25 niños de edades comprendidas entre los 6 y 10 años sin comparar con un grupo control. Observaron una bajada estadísticamente significativa en los niveles de *S.mutans* en saliva 30 días después de haber empezado a administrar el yogurt; es decir, 16 días después de haber dejado de tomar yogurt con probiótico. Sin embargo, los valores de lactobacilos salivares se mantuvieron. Ahola y cols. (109) también realizaron un estudio utilizando *LGG* como probiótico en 83 adultos jóvenes de edades comprendidas entre los 18 y 35 años, divididos en un grupo experimental y un grupo control. En el grupo de estudio se les dio queso con probiótico una vez al día durante tres semanas. En este estudio también se observó que una vez terminado el periodo de toma del probiótico, en concreto 3 semanas después, se vio una bajada estadísticamente significativa de los valores salivares de *S.mutans*. Por el contrario, no hubo variaciones en los niveles de *Lactobacillus sp.*

Näse y cols. (29) también utilizaron como probiótico el *LGG* en una muestra de 594 participantes de edades comprendidas entre 1 y 6 años. El estudio tuvo una duración de 7 meses, en los cuales se les administraba a los niños del grupo experimental leche con probiótico durante los cinco días de la semana que acudían a centros educativos. Al finalizar los 7 meses de tratamiento se observó un descenso en el número de *S.mutans* en saliva en el grupo experimental con respecto al grupo control, sobre todo en niños de 3 y 4 años, aunque la reducción no fue estadísticamente significativa. Juneja y cols. (105) hicieron un estudio con el objetivo de evaluar los niveles salivares de *S.mutans* utilizando como probiótico *L. rhamnosus hct 70*. en una muestra de 40 niños de edades comprendidas entre los 12 y 15 años durante tres semanas. Los niños del grupo experimental ingerían leche con probiótico y los niños del grupo control leche sola. Tras la ingesta del probiótico y hasta tres semanas después de haber dejado de tomarlo se observó un descenso estadísticamente significativo. En la literatura también se han encontrado estudios donde se administró al grupo experimental una combinación de probióticos como *L. rhamnosus* y ciertas especies de *Bifidobacterium*. Este es el caso del estudio llevado a cabo por Jindal y cols. (94), con una muestra de 150 niños de edades comprendidas entre los 7 y 14 años y una duración de 14 días. A pesar de la corta duración del estudio se obtuvieron resultados satisfactorios, observándose a los 14 días tras el inicio del tratamiento un descenso estadísticamente significativo de los niveles salivares de *S. mutans* en el grupo experimental respecto al grupo control.

Çaglar y cols. (34) utilizaron *Bifidobacterium DN-173 010* y *B. lactis Bb-12* (33) en dos estudios cuyo objetivo consistía en evaluar la acción del probiótico sobre los niveles de *S.mutans*. En el estudio donde utilizó como probiótico *Bifidobacterium DN-173 010* (34) administraron a 26 sujetos sanos con una media de edad de 22 años un yogurt (Activia®) con  $7 \times 10^7$  (UFC) de probiótico, mientras que al grupo

control se le administró un yogurt sin probiótico (Danone Natural®) durante 28 días. Se les tomó muestras de saliva estimulada a los 15 y a los 28 días de haber empezado el periodo de intervención y mediante el uso de Dentocut SM® y Dentocult LB® se cuantificaron los niveles salivares de *S. mutans* y *Lactobacillus sp.* En los resultados obtuvieron una disminución significativa en los niveles de *S. mutans* en el grupo experimental respecto al control, mientras que la reducción que obtuvieron de *Lactobacillus sp.* no fue estadísticamente significativa.

En el estudio de Çağlar y cols. donde se utilizó como probiótico el *B. lactis Bb-12* (33) tuvieron una muestra de 24 sujetos sanos con una edad media de 20 años. Se les administró helado con  $1 \times 10^7$  (UFC) de probiótico o helado sin probiótico durante 28 días. Se recolectó la saliva estimulado de los sujetos a los 15 y 28 días para medir mediante el test CRT® los recuentos de *S. mutans* y *Lactobacillus sp.* en saliva. En cuanto a los resultados obtenidos observaron una disminución significativa en los niveles de *S. mutans* en el grupo experimental respecto al control, mientras que la reducción que obtuvieron de *Lactobacillus sp.* no fue estadísticamente significativa. Otros autores como Kavaloglu Cildir y cols. (88) y Singh y cols. (129) también utilizaron *Bifidobacterium* como probiótico. En el caso de Kavaloglu Cildir y cols. utilizaron *Bifidobacterium animalis subsp. lactis DN-173 010* en una muestra de 24 adolescentes con edades entre los 12 y 16 años con tratamiento ortodóncico. El grupo experimental tomó un yogurt de frutas con  $2 \times 10^8$  (UFC) de probiótico diariamente durante 28 días. Se les tomó muestras de saliva estimulada para cuantificar *S. mutans* y *Lactobacillus sp.* con el test CRT® antes y después del periodo de intervención. Los resultados mostraron una disminución significativa en los niveles de *S. mutans* en el grupo experimental respecto al control, mientras que la reducción que obtuvieron de *Lactobacillus sp.* no fue estadísticamente significativa. Singh y cols. (129) emplearon *B. lactis Bb-12* como probiótico en una muestra de 40 sujetos con edades entre los 12 y 14 años, quienes durante 10 días tomaron helado con  $1 \times 10^6$  (UFC) de probiótico en el caso del grupo experimental o sin el probiótico. Antes y después del periodo de intervención se les tomó muestras de saliva estimulada para cuantificar los niveles de *S. mutans* y de *Lactobacillus sp.*, obteniendo una reducción estadísticamente significativa de los niveles de *S. mutans* en saliva en el grupo experimental respecto al control, pero no una reducción significativa en los niveles del *Lactobacillus sp.*

En nuestro estudio se ha utilizado en el grupo experimental un comprimido probiótico elaborado con una combinación de cepas de *L. reuteri*, la DSM 17936 y la ATCC PTA 5289. Çağlar utilizó como probiótico *L. reuteri* ATCC 55730 en varias de sus investigaciones (30, 32, 35). Al igual que en nuestro estudio se observó un efecto beneficioso del uso del probiótico en los niveles salivares de *S. mutans* pero no hubo variaciones en los niveles de *Lactobacillus sp.* entre el grupo experimental y el grupo control.

Çağlar y cols. (30), en uno de sus estudios, evaluaron el efecto que tenían chicles con xilitol y con probiótico en los recuentos salivares del *S. mutans* y *Lactobacillus sp.* A una muestra de 80 adultos

jóvenes con edades entre los 21 y 24 años la dividió aleatoriamente en cuatro grupos: A, grupo que tomó chicle con probiótico, B, grupo que tomó chicle con xilitol, C, grupo de chicle con xilitol y probiótico y D, el grupo control. El chicle lo masticaban tres veces al día después de las comidas durante 21 días. El probiótico que había en el chicle consistía en dos cepas de *L. reuteri*, ATCC 55730 con una dosis de  $1 \times 10^8$  (UFC) y ATCC PTA 5289 con una dosis de  $1 \times 10^8$  (UFC). Se recogieron muestras de saliva estimulada antes y después del periodo de intervención y se evaluaron los niveles salivares de *S. mutans* y de *Lactobacillus* con Dentocult SM<sup>®</sup> y Dentocult LB<sup>®</sup>. Se constató una disminución de los niveles salivares de *S. mutans* estadísticamente significativa tanto en los grupos A y B. En el grupo C también se observó una tendencia similar pero no significativa estadísticamente. Sin embargo, no se obtuvieron alteraciones en el recuento salivar de lactobacilos. en ninguno de los grupos.

En otro estudio de Çaglar y cols. (32) se administró como probiótico *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 en dos diferentes vehículos en una muestra de 120 adultos jóvenes con edades entre los 21 y 24 años. El objetivo de esta investigación era saber cómo afectaba cada una de estas formas de administración en el recuento salivar de *S. mutans* y *Lactobacillus sp.* Una de las formas de administración consistía en una pajita que contenía el probiótico y la otra forma era un comprimido con el probiótico. La muestra fue aleatoriamente dividida en 4 grupos. El grupo A bebió 200 ml de agua una vez al día durante 21 días a través de una pajita que contenía  $10^8$  (UFC) de probiótico, el grupo B bebió 200 ml de agua a través de una pajita de placebo durante el mismo periodo, al grupo C se le dio un comprimido que contenía  $10^8$  (UFC) de probiótico una vez al día durante 21 días, mientras que al grupo D se le dio un comprimido que no contenía probiótico durante el mismo periodo. Se recogió la saliva estimulada de todos los participantes del estudio antes y después del periodo de intervención y mediante el Dentocult SM<sup>®</sup> y el Dentocult LB<sup>®</sup> se evaluaron los recuentos salivares de los microorganismos. Se vió en los resultados que hubo una disminución estadísticamente significativa en los niveles de *S. mutans* en los grupos A y C, en contraste con los grupos control (B y D). Una similar aunque no significativa tendencia fue vista con *Lactobacillus sp.*

En otro de sus estudios Çaglar y cols. (35) investigó si *L. reuteri* ATCC 55730 podía ser detectado en la cavidad oral después de una administración discontinua. El diseño del estudio consistió en tres periodos de dos semanas cada uno: aclaramiento, intervención y post-tratamiento. Durante el periodo de aclaramiento y el de post-tratamiento estaba prohibido que los participantes tomaran probióticos. La muestra consistía en 25 adultos jóvenes de edades entre los 21 y 22 años a quienes se les administró un comprimido masticable que contenía  $10^8$  (UFC/comprimido). En este estudio no hubo grupo control. Se recogió una muestra de saliva a todos los participantes una vez después del periodo de aclaramiento y diariamente durante del periodo de intervención hasta que hubiese restos de probiótico en las muestras. El análisis fue llevado a cabo usando un medio de cultivo selectivo para el *L. reuteri*. Ninguno de los

participantes tenía *L. reuteri* en su saliva después del periodo de aclaramiento. El primer día después del periodo de intervención 12 participantes (48%) dieron positivo para *L. reuteri*. Después fue decreciendo gradualmente hasta que tras 7 días solo dos de los participantes albergaban el probiótico.

Los tiempos de administración del probiótico varían mucho entre los diferentes estudios. Para lograr establecer el efecto cariostático deseado del probiótico, éste debería adherirse a la superficie dental y ser parte de la biopelícula, de manera que pueda competir con las bacterias cariogénicas. Para ello la bacteria probiótica debería administrarse de manera continua y lograr permanecer por un período prolongado (63). En la mayoría de los estudios revisados el tiempo de administración del probiótico oscila entre 14 y 21 días (30, 32, 88, 94, 129). Ese es el motivo por el cual en nuestra investigación administramos probiótico durante 28 días.

Existe un desconocimiento en determinar cuánto tiempo permanece el probiótico en la saliva una vez cesa su administración (35, 63). En el estudio de Yli-Knuutila y cols. (36) observaron que después de haber administrado el probiótico *LGG* durante 14 días su número en la cavidad oral decreció gradualmente, indicando que no existe una colonización permanente y que la persistencia oral de *LGG* es sólo temporal. Al igual que Çağlar y cols. (35), mostró que la presencia de *L. reuteri* en saliva sólo es temporal y desaparece una vez se finaliza su administración. En nuestro estudio pudimos comprobar que 17 días después de haber cesado la administración del probiótico éste mantenía su efecto sobre los niveles de *S. mutans* en saliva entre el grupo control y el grupo experimental.

Las bacterias probióticas orales deben formar parte del *biofilm* para ejercer correctamente su función. No deben fermentar los azúcares, evitando bajadas de pH y facilitando el desarrollo de lesiones de caries (35, 44). Aunque desde un punto de vista teórico este hecho podría ser plausible, en la actualidad no hay pruebas para apoyar totalmente esta sugerencia (127). Sí hay evidencia de que los probióticos ejercen su efecto sin colonizar o solo con una colonización temporal del huésped (35, 36, 39, 82). Tan pronto como se detiene su consumo, las bacterias probióticas son excretadas. La observación de que las bacterias probióticas no tienen necesariamente que colonizar permanentemente el huésped para ejercer sus efectos puede ser atribuido a sus mecanismos de acción, entre los que se encuentran 1) la modulación de las defensas del huésped, tanto de la inmunidad adquirida innata como la adquirida, 2) la producción de sustancias antimicrobianas contra patógenos periodontales y 3) los mecanismos de exclusión competitiva como son a) impedir la adhesión de bacterias patógenas y b) competir por los mismos nutrientes (26).

### *Efecto de los probióticos sobre los indicadores de salud*

En relación a los hábitos dietéticos y de higiene bucodental en nuestro estudio obtuvimos un patrón de correlaciones débil con los índices de salud bucodental. Sin embargo, se observó una correlación positiva y significativa entre la puntuación obtenida del cuestionario y el índice de placa, lo que indica que unos peores hábitos dietéticos y de higiene bucodental pueden asociarse con un mayor crecimiento de la placa, coincidiendo con autores como Tinanoff y cols. (3, 130) en dos de sus estudios y Chávez-Vereau y cols. (131). Sí se han encontrado diferencias en los hábitos dietéticos al analizar el sexo del individuo, observando que las niñas tienden a un mayor consumo de frutas y de alimentos con azúcares. Asimismo, las niñas presentaron también unos hábitos higiénicos algo peores que los niños, incluso acudiendo a sus visitas al odontólogo con menor frecuencia. Estos resultados son opuestos a los encontrados por Almerich-Silla y cols. (132) en su encuesta sobre hábitos higiénicos orales en la población adolescente de la Comunidad Valenciana, donde observaron que las chicas presentaron mejores hábitos de higiene oral (mayor cepillado diario, mayores visitas al odontólogo) y dieta (menor ingesta de azúcares) a los 15-16 años que los chicos, obteniendo diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados obtenidos por Almerich-Silla y cols. coinciden con los resultados obtenidos por González de Dios y cols. (133) en un estudio de hábitos de higiene bucodental que realizó en una población de preadolescentes y adolescentes de la provincia de Alicante donde concluyó que las niñas tenían mejores hábitos de higiene bucodental que los niños, su frecuencia de cepillado después de las comidas era mayor que la de los niños y eran más conscientes que había que cepillarse por razones de higiene, mientras que los niños se cepillaban los dientes por obligación. Por el contrario, en este estudio, sí se observó que las niñas ingerían más alimentos azucarados que los niños, resultados que coinciden con nuestra investigación.

Al analizar en nuestro estudio la relación entre la edad y los hábitos alimenticios e higiénicos observamos que no se ven diferencias importantes entre los individuos por grupos de edad, salvo en la frecuencia del cepillado de dientes después de las comidas, donde sí vimos una diferencia estadísticamente significativa, siendo los niños menores de 14 años quienes se cepillan menos después de las comidas. Al preguntarles si les sangraban las encías cuando se cepillaban los dientes también observamos que con más frecuencia había sangrado en los niños menores de 14 años. Estos datos coinciden con los datos de la Encuesta de Salud de España publicada en el año 2010 (115) por Llodrá donde el 67,9% de los niños de 12 años se cepillaban los dientes más de una vez al día y los niños de 15 años lo hacían el 71,7%.

Este estudio presenta algunas limitaciones que es necesario señalar. Por un lado el tamaño de muestra no ha sido lo suficientemente grande para mostrar diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Se optó por reclutar grupos de 30 niños en base a criterios estadísticos (a partir de

este número se considera una muestra grande), pero sin poder precisar más por la escasez de estudios previos que nos pudieran guiar en la generación de hipótesis concretas sobre el tamaño del efecto esperado. Por otro lado, por distintas causas tuvimos dificultades para completar el seguimiento de algunos de los niños reclutados, inconvenientes propios de los estudios longitudinales, lo que muestra que no resulta sencillo mantener el cumplimiento en este tipo de estudios. Asimismo, hemos tenido dificultades para que los participantes tomaran los comprimidos diariamente, ya se tratase de probióticos o de placebo, debido a que la implicación de los profesores en el estudio no ha sido la esperada. Hubo muchos olvidos en la entrega de los comprimidos por parte del profesorado. Además, el estudio se llevó a cabo en periodo invernal, lo que provocó que hubiese ausencias por enfermedad. Esas fueron las mayores limitaciones que nos encontramos durante el estudio. A pesar de ello, hemos utilizado un diseño robusto (ensayo clínico aleatorizado) intentando minimizar las pérdidas de seguimiento y la comisión de sesgos. Los sujetos perdidos no fueron diferentes a los que finalmente terminaron en cuanto a su distribución por edad y sexo, disminuyendo de esta forma el sesgo en los resultados.

Existe una gran heterogeneidad entre los estudios con diferentes dosis de probióticos, duración de los tratamientos, el tipo de probiótico utilizado, tipo de pacientes (sanos, con enfermedad periodontal), grupo de edad, tamaño de muestra y tipo de vehículo. Diferentes alimentos de consumo diario como queso, yogurt y leche son considerados buenos vehículos para administrar los probióticos, pero el vehículo ideal de administración todavía no ha sido identificado (134). Una solución que sugiere Cagetti y cols. (11) podría ser integrar el probiótico en la pasta dental al igual que ocurre con el flúor. En lo que respecta a los modos de aplicación, el vehículo mediante el cual se ingieren o se liberan en la cavidad oral también puede influir en su potencial terapéutico y en la colonización de un probiótico. Los datos disponibles en la actualidad hacen que sea imposible extraer ninguna conclusión firme, dada la gran variedad de vehículos de liberación. Por tanto, los resultados deben interpretarse con cautela debido a todas estas limitaciones metodológicas (127).

En España, los probióticos son comercializados en farmacias y parafarmacias en forma de comprimidos mentolados. Su uso está dirigido a mejorar parámetros gingivales en pacientes adultos con al menos un inicio de enfermedad gingival establecida. En los niños únicamente se indican en procesos gastrointestinales. La mayor cantidad de investigaciones realizadas son en el campo de la prevención de la enfermedad periodontal y de la caries en adultos. En niños es un campo aún abierto a realizar futuras investigaciones. Por ello, hemos querido realizar esta investigación en niños de 12 a 18 años, porque pensamos que las estrategias preventivas deben instaurarse desde la infancia para así ser más efectivas. Pero la prevención no debe establecerse solo a nivel bacteriano. Debemos ser conscientes de que existen un número importante de variables que afectan a la salud bucal, como son los hábitos higiénicos y

dietéticos. Por ello hemos querido indagar en los factores que influyen en la salud bucal de los pacientes infantiles.

La encuesta ha sido un instrumento de valoración de los hábitos dietéticos e higiénicos de los niños incluidos en el estudio. Al no disponer de una encuesta específica para el objetivo que nos proponíamos decidimos crear una encuesta *ad hoc*, lo cual dificulta la comparabilidad con otros trabajos. Sin embargo, sí que ha sido lo suficientemente sensible para relacionarse con algunos de los indicadores bucodentales analizados y para detectar las tendencias de estos hábitos y sus diferencias entre grupos de edad y sexo.

El campo de estudio del efecto de los probióticos sobre distintos parámetros bucodentales es muy amplio y lleno de posibilidades en el marco de la prevención. Por ello es importante que los investigadores continúen realizando estudios en esta línea. En futuras líneas de investigación nos gustaría ampliar la muestra de escolares, para así poder obtener resultados más concluyentes. Al mismo tiempo que se amplíe la muestra de escolares sería importante aumentar el número de registros de las variables en el tiempo una vez finalizada la toma del probiótico, ya que hemos observado en los resultados que una vez terminado el periodo de intervención se mantiene el beneficio del efecto sobre algunos de los parámetros bucodentales, pero no está determinado hasta cuándo se mantiene el efecto.

# **CONCLUSIONES**

1. Los resultados de este estudio nos muestran que la ingesta diaria de probiótico durante 28 días produce una disminución en los niveles de *S. mutans* y de *Lactobacillus sp.* en saliva.
2. Se pudo observar que el *índice de placa*, el *índice de gingivitis* y el *índice de hemorragia* en el grupo que tomó el probiótico era más bajo en comparación con el grupo placebo aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos.
3. El valor de pH en el grupo experimental presentó un ascenso más lento respecto al grupo control aunque no fue estadísticamente significativo.
4. Las niñas tienden a un mayor consumo de frutas y de alimentos ricos en azúcares.
5. Las niñas presentaron unos hábitos higiénicos algo peores que los niños, añadido al hecho de que los niños visitan más al dentista que las niñas.
6. Al analizar la edad de los escolares con los hábitos alimenticios e higiénicos no hemos visto diferencias importantes entre los mismos, salvo en la frecuencia del cepillado de dientes después de las comidas. Los escolares menores de 14 años se cepillan los dientes con menor frecuencia que los mayores de 14 años y cuando se los cepillan les sangran las encías, siendo este resultado estadísticamente significativo.
7. Se observó una correlación positiva y significativa entre la puntuación obtenida en la encuesta y el índice de placa, lo que conlleva que unos peores hábitos dietéticos y de higiene bucodental pueden asociarse a estas edades con un mayor crecimiento de la placa.
8. Se precisan más estudios clínicos a largo plazo para conocer mejor la acción mantenida de las bacterias probióticas en la cavidad oral, así como su capacidad de colonización y formación de biofilms que permitan averiguar de qué modo afectan a la flora residente.

# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Poyato Ferrera M, Segura Egea J, Ríos Santos V, Bullón Fernández P. La placa bacteriana: Conceptos básicos para el higienista bucodental. *Periodoncia*. 2001;11(Nº2. Fasc. 5):149.
2. Furuichi Y, Lindhe J, Ramberg P, Volpe AR. Patterns of de novo plaque formation in the human dentition. *J Clin Periodontol*. 1992;19(6):423-33.
3. Tinanoff N, Kanellis M, Vargas C. Current understanding of the epidemiology, mechanisms, and prevention of dental caries in preschool children. *Pediatr Dent*. 2002;24(6):543-51.
4. Boj J, Catalá M, García-Ballesta C, Mendoza A, Planells P. Odontopediatría. La evolución del niño al adulto. In: Ripano, editor. ; 2011. p. 212.
5. Hernández EL, Hernández ML, Delgado NS. Factores de riesgo de caries dental en niños. *Medisur: Revista Electrónica de las Ciencias Médicas en Cienfuegos*. 2007;5(2):16-21.
6. Poland C, Hale KJ. Providing oral health to the little ones. *J Indiana Dent Assoc*. 2003-2004 Winter; 82(4):8-14.
7. Habibian M, Beighton D, Stevenson R, Lawson M, Roberts G. Relationships between dietary behaviours, oral hygiene and mutans streptococci in dental plaque of a group of infants in southern England. *Arch Oral Biol*. 2002;47(6):491-8.
8. Vitoria Miñana I. Promoción de la salud bucodental. *Pediatría Atención Primaria*. 2011;13(51):435-58.
9. Featherstone JD. The caries balance: contributing factors and early detection. *J Calif Dent Assoc*. 2003 Feb;31(2):129-33.
10. Featherstone JD. Caries prevention and reversal based on the caries balance. *Pediatr Dent*. 2006; 28(2):128-32.
11. Cagetti MG, Mastroberardino S, Milia E, Cocco F, Lingström P, Campus G. The use of probiotic strains in caries prevention: a systematic review. *Nutrients*. 2013;5(7):2530-50.
12. Barbería E. Atlas de odontología infantil para pediatras y odontólogos. Madrid: Ripano. 2005.
13. Lactancia materna. Preguntas más frecuentes (FAQ) [Internet]. Available from: [http://www.odontologiapediatrica.com/odontologia\\_bebes1](http://www.odontologiapediatrica.com/odontologia_bebes1).
14. Featherstone JD. The science and practice of caries prevention. *JADA*. 2000;131(7):887-900.
15. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol*. 2002 Mar;40(3):1001-9.
16. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century—the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2003;31(s1):3-24.
17. Palmer CA, Kent R, Loo CY, Hughes CV, Stutius E, Pradhan N, et al. Diet and caries-associated bacteria in severe early childhood caries. *J Dent Res*. 2010 Nov;89(11):1224-9.

18. Montejo EAH, Rodríguez RS, Integral EG. Morbilidad por caries dental como urgencia estomatológica en la población menor de 19 años [Tesis]. Yaracuy: Universidad de San Felipe (Yaracuy). Facultad de estomatología; 2007.
19. Cortés O, Beltri P, Miegimolle M, Ortego G, Barrachina M, Hernández M. Recomendaciones de dieta para niños y adolescentes. *Odontología Pediátrica*. 2009;17(3):207-8.
20. Johansson I, Holgerson PL, Kressin NR, Nunn ME, Tanner AC. Snacking habits and caries in young children. *Caries Res*. 2010;44(5):421-30.
21. Franquet M, Palma C, Cahuana A. Nutrición y alimentación en la infancia del siglo XXI. *Odontol Pediatr (Madrid)*. 2009;17(2):105-15.
22. Kranz S, Smiciklas-Wright H, Francis LA. Diet quality, added sugar, and dietary fiber intakes in American preschoolers. *Pediatr Dent*. 2006;28(2):164-71.
23. Marshall TA, Eichenberger-Gilmore JM, Broffitt BA, Warren JJ, Levy SM. Dental caries and childhood obesity: roles of diet and socioeconomic status. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2007;35(6):449-58.
24. Lamas Oliveira M. Estudio de la colonización por estreptococos mutans y hábitos dietéticos durante la lactancia y primera infancia [tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Odontología; 2004.
25. Tsai AI, Chen C, Li L, Hsiang C, Hsu K. Risk indicators for early childhood caries in Taiwan. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2006;34(6):437-45.
26. Iniesta M, Montero E, Zurbriggen M, Herrera D. El control del biofilm y los probióticos. *Periodoncia y Osteointegración*. 2012;22(4):273.
27. de Estrada Riverón, Johany Duque, Fuentes IH, Martell YD. Microorganismos probióticos en la prevención de caries dentales. *Medisur*. 2010;8(5):371-6.
28. Çağlar E, Kargul B, Tanboga I. Bacteriotherapy and probiotics' role on oral health. *Oral Dis*. 2005;11(3):131-7.
29. Näse L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Pönkä A, Poussa T, 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(6):412-20.
30. Çağlar E, Kavaloglu S, Kuscu O, Sandalli N, Holgerson P, Twetman S. Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Clin Oral Investig*. 2007;11(4):425-9.
31. Çağlar E, Kuscu OO, Cildir SK, Kuvvetli SS, Sandalli N. A probiotic lozenge administered medical device and its effect on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *International Journal of Paediatric Dentistry*. 2008;18(1):35-9.
32. Çağlar 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*. 2006;64(5):314-8.

33. Caglar E, Onder Kuscu O, Selvi Kuvvetli S, Kavaloglu Cildir S, Sandalli N, Twetman S. Short-term effect of ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on the number of salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Acta Odontologica*. 2008;66(3):154-8.
34. Caglar E, Sandalli N, Twetman S, Kavaloglu S, Ergeneli S, Selvi S. Effect of yogurt with *Bifidobacterium* DN-173 010 on salivary mutans streptococci and lactobacilli in young adults. *Acta Odontologica*. 2005;63(6):317-20.
35. Caglar E, Topcuoglu N, Cildir SK, Sandalli N, Kulekci G. Oral colonization by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 after exposure to probiotics. *International Journal of Paediatric Dentistry*. 2009;19(5):377-81.
36. Yli-Knuutila H, Snäll J, Kari K, Meurman JH. Colonization of *Lactobacillus rhamnosus* GG in the oral cavity. *Oral Microbiol Immunol*. 2006;21(2):129-31.
37. Laleman I, Detailleur V, Slot DE, Slomka V, Quirynen M, Teughels W. Probiotics reduce mutans streptococci counts in humans: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig*. 2014:1-14.
38. Losada M, Vicario M, Pujol À, Sanz J, Nart J. Probióticos: ¿una opción de futuro? *Periodoncia y Osteointegración*. 2012;22(1):59.
39. Meurman J, Stamatova I. Probiotics: contributions to oral health. *Oral Dis*. 2007;13(5):443-51.
40. Martínez B, Ruiz F. Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2004;9:S92-107.
41. Connolly E. *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730: a clinically proven probiotic. *Nutrafoods*. 2004; 3(1):15-22.
42. Tormo Carnicé R. Probióticos. Concepto y mecanismos de acción. *Anales de Pediatría*; 2006.
43. López B, Domingo D. Antibioticoterapia con probióticos. *Rev.Esp.Quimioterap*.XX. 2007:170-81.
44. Meurman JH. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *Eur J Oral Sci*. 2005; 113(3):188-96.
45. Goldin BR, Gorbach SL. Clinical indications for probiotics: an overview. *Clin Infect Dis*. 2008 Feb 1; 46 Suppl 2:S96-100;46 Suppl 2:S96,100; discussion S144-51.
46. Flichy-Fernández AJ, Alegre-Domingo T, Peñarrocha-Oltra D, Peñarrocha-Diago M. Probiotic treatment in the oral cavity: An update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010;15(5):e677-80.
47. Twetman S, Keller MK. Probiotics for caries prevention and control. *Adv Dent Res*. 2012 Sep; 24(2):98-102.
48. Twetman S, Stecksén-Blicks C. Probiotics and oral health effects in children. *International journal of paediatric dentistry*. 2008;18(1):3-10.
49. Itsaranuwat P, Al-Haddad KS, Robinson R. The potential therapeutic benefits of consuming 'health-promoting' fermented dairy products: a brief update. *International journal of dairy technology*. 2003;56(4):203-10.

50. Brown AC, Valiere A. Probiotics and medical nutrition therapy. *Nutr Clin Care*. 2004 Apr-Jun; 7(2):56-68.
51. Lorente BF, Serra JD. Alimentos funcionales: probióticos. *Acta Pediatr Espan*. 2001;59(3):150-5.
52. DeBowes S. Does Probiotic mean anti-dental disease?. *ADHA*. 2011; April:7.
53. O'sullivan M, Thornton G, O'sullivan G, Collins J. Probiotic bacteria: myth or reality? *Trends Food Sci Technol*. 1992; 3:309-14.
54. Reddy NV, Rao AP, Mohan G, Kumar RR. Probiotic Lactobacilli and oral health. *Annals & Essences of Dentistry*. 2011;3(2).
55. Stamatova I, Meurman JH. Probiotics and periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2009;51(1):141-51.
56. Stamatova I, Meurman JH. Probiotics: health benefits in the mouth. *Am J Dent*. 2009;22(6):329-38.
57. He X, Lux R, Kuramitsu HK, Anderson MH, Shi W. Achieving probiotic effects via modulating oral microbial ecology. *Adv Dent Res*. 2009;21(1):53-6.
58. Stecksen-Blicks C, Sjostrom I, Twetman S. Effect of long-term consumption of milk supplemented with probiotic lactobacilli and fluoride on dental caries and general health in preschool children: a cluster-randomized study. *Caries Res*. 2009;43(5):374-81.
59. Chuang L, Huang C, Ou-Yang L, Lin S. Probiotic *Lactobacillus paracasei* effect on cariogenic bacterial flora. *Clin Oral Investig*. 2011;15(4):471-6.
60. Muñoz Salas K, Alarcón Palacios M. Efecto de los Probióticos en las Condiciones Periodontales. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*. 2010;3(3):136-9.
61. Collado M. Caracterización de cepas del género *Bifidobacterium* con carácter probiótico [Tesis doctoral]. Valencia: Universitat Politècnica de València. Escuela técnica superior de Ingenieros agrónomos, 2005.
62. Saha S, Tomaro-Duchesneau C, Rodes L, Malhotra M, Tabrizian M, Prakash S. Investigation of probiotic bacteria as dental caries and periodontal disease biotherapeutics. *Beneficial microbes*. 2014; 5(4):447-60.
63. Pérez-Luyo A. Probióticos: ¿una nueva alternativa en la prevención de la caries dental. *Rev.Estomatol.Herediana*. 2008;18(1):65-8.
64. Ortiz Esteve E, Guinot Jimeno F, Mayné Acién R, Bellet Dalmau L. Probióticos: efecto preventivo sobre la caries dental. Revisión de la literatura. *Odontol Pediatr*. 2009;17(3):169-78.
65. Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut*. 1991 Apr;32(4):439-42.
66. AFRC RF. Probiotics in man and animals. *J Appl Microbiol*. 1989;66(5):365-78.
67. Informe de la Consulta de Expertos FAO/OMS. Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. 2006; 85.

68. Gorbach S. Probiotics in the third millennium. *Digestive and Liver Disease*. 2002;34:S2-7.
69. Bosch M, Nart J, Audivert S, Bonachera MA, Alemany AS, Fuentes MC, et al. Isolation and characterization of probiotic strains for improving oral health. *Arch Oral Biol*. 2012;57(5):539-49.
70. Twetman S. Are we ready for caries prevention through bacteriotherapy? *Brazilian oral research*. 2012;26(SPE1):64-70.
71. Guandalini S. Probiotics for children: use in diarrhea. *J Clin Gastroenterol*. 2006;40(3):244-8.
72. Doron S, Gorbach SL. Probiotics: their role in the treatment and prevention of disease. *Expert rev anti infect ther*. 2006;4(2):261-75.
73. Guandalini S. Probiotics for prevention and treatment of diarrhea. *J Clin Gastroenterol*. 2011 Nov;45 Suppl:S149-53.
74. Sinkiewicz G, Cronholm S, Ljunggren L, Dahlén G, Bratthall G. Influence of dietary supplementation with *Lactobacillus reuteri* on the oral flora of healthy subjects. *Swed Dent J*. 2010;34:197-206.
75. Kekkonen R, Kumpu M, Myllyluoma E, Saxelin M. LGG<sup>®</sup>, Summatim. Efectos en la salud de *Lactobacillus GG*<sup>®</sup>. Helsinki: Valio Ltd. 2009.
76. Wanke M, Szajewska H. Lack of an Effect of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in Preventing Nosocomial Diarrhea in Children: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *J Pediatr*. 2012;161(1):40,43. e1.
77. Fernández OA, Aladrén BS. Diarrea postantibiótica. Colitis por *Clostridium difficile*. Tratamiento de las enfermedades gastroenterológicas, Elsevier, Barcelona. 2011:213-21.
78. Arvola T, Laiho K, Torkkeli S, Mykkänen H, Salminen S, Maunula L, et al. Prophylactic *Lactobacillus GG* Reduces Antibiotic-Associated Diarrhea in Children With Respiratory Infections: A Randomized Study. *Pediatrics*. 1999;104(5):e64-.
79. Vanderhoof JA, Whitney DB, Antonson DL, Hanner TL, Lupo JV, Young RJ. *Lactobacillus GG* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *J Pediatr*. 1999;135(5):564-8.
80. Minocha A. Probiotics for preventive health. *Nutr Clin Pract*. 2009 Apr-May;24(2):227-41.
81. Iniesta M, Zurbriggen M, Montero E, Herrera D. Los probióticos y sus beneficios terapéuticos. *Osteointegración*. 2011:171.
82. Busscher HJ, Mulder AF, van der Mei HC. In vitro adhesion to enamel and in vivo colonization of tooth surfaces by *Lactobacilli* from a bio-yoghurt. *Caries Res*. 1999 Sep-Oct;33(5):403-4.
83. Twetman L, Larsen U, Fiehn N, Stecksén-Blicks C, Twetman S. Coaggregation between probiotic bacteria and caries-associated strains: an in vitro study. *Acta Odontologica*. 2009;67(5):284-8.
84. Keller MK, Hasslöf P, Stecksén-Blicks C, Twetman S. Co-aggregation and growth inhibition of probiotic *Lactobacilli* and clinical isolates of mutans streptococci: an in vitro study. *Acta Odontol Scand*. 2011;69(5):263-8.

85. Meurman J, Antila H, Korhonen A, Salminen S. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 53103) on the growth of *Streptococcus sobrinus* in vitro. *Eur J Oral Sci.* 1995;103(4):253-8.
86. Comelli EM, Guggenheim B, Stingle F, Neeser J. Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health. *Eur J Oral Sci.* 2002;110(3):218-24.
87. Sanz Y DJ. Los probióticos en el marco de la nueva normativa europea que regula los alimentos funcionales. *Acta Pediátrica Española.* 2008;66(1):27-31.
88. Cildir SK, Germec D, Sandalli N, Ozdemir FI, Arun T, Twetman S, et al. Reduction of salivary mutans streptococci in orthodontic patients during daily consumption of yoghurt containing probiotic bacteria. *Eur J Orthod.* 2009 Aug;31(4):407-11.
89. Wolf B, Garleb K, Ataya D, Casas I. Safety and tolerance of *Lactobacillus reuteri* in healthy adult male subjects. *Microb Ecol Health Dis.* 1995;8(2):41-50.
90. Casas IA, Dobrogosz WJ. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals. *Microb Ecol Health Dis.* 2000;12(4):247-85.
91. Weizman Z, Alsheikh A. Safety and tolerance of a probiotic formula in early infancy comparing two probiotic agents: a pilot study. *J Am Coll Nutr.* 2006;25(5):415-9.
92. Speck ML, Dobrogosz WJ, Casas IA. *Lactobacillus reuteri* in Food Supplementation. *Food Technology.* 1993;July: 90.
93. Glavina D, Goršeta K, Škrinjarić I, Negovetić Vranić D, Mehulić K, Kožul K. Effect of LGG yoghurt on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. salivary counts in children. *Coll Antropol.* 2012; 36(1):129-32.
94. Jindal G, Pandey R, Agarwal J, Singh M. A comparative evaluation of probiotics on salivary mutans streptococci counts in Indian children. *European Archives of Paediatric Dentistry.* 2011;12(4):211-5.
95. Hedberg M, Hasslöf P, Sjöström I, Twetman S, Stecksén-Blicks C. Sugar fermentation in probiotic bacteria—an in vitro study. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23(6):482-5.
96. Samot J, Lebreton J, Badet C. Adherence capacities of oral lactobacilli for potential probiotic purposes. *Anaerobe.* 2011;17(2):69-72.
97. Haukioja A, Yli-Knuutila H, Loimaranta V, Kari K, Ouwehand A, Meurman JH, et al. Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21(5):326-32.
98. Lexner MO, Blomqvist S, Dahlén G, Twetman S. Microbiological profiles in saliva and supragingival plaque from caries-active adolescents before and after a short-term daily intake of milk supplemented with probiotic bacteria—a pilot study. *Oral Health Prev Dent.* 2010;8(4):383-8.
99. Nikawa H, Makihira S, Fukushima H, Nishimura H, Ozaki Y, Ishida K, et al. *Lactobacillus reuteri* in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. *Int J Food Microbiol.* 2004;95(2):219-23.

100. Sudhir R, Praveen P, Anantharaj A, Venkataraghavan K. Assessment of the effect of probiotic curd consumption on salivary pH and streptococcus mutans counts. *Niger Med J*. 2012 Jul;53(3):135-9.
101. Valeur N, Engel P, Carbajal N, Connolly E, Ladefoged K. Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol*. 2004 Feb;70(2):1176-81.
102. 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(2):55-60.
103. 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 Nov 2;2:10.3402/jom.v2i0.5344.
104. Cabria MH, Echevarría FJ, Iglesias JR. La leche como alimento funcional. Guía de buena práctica clínica en Alimentos Funcionales. Corporación alimentaria Peñasanta, S. A. (CAPSA). 2011;93-105.
105. Juneja A, Kakade A. Evaluating the effect of probiotic containing milk on salivary mutans streptococci levels. *J Clin Pediatr Dent*. 2012;37(1):9-14.
106. Keller M, Larsen IN, Karlsson L, Twetman S. Effect of tablets containing probiotic bacteria (*Lactobacillus reuteri*) on early caries lesions in adolescents: a pilot study. *Beneficial Microbes*. 2014:1-5.
107. Marttinen A, Haukioja A, Karjalainen S, Nylund L, Satokari R, Öhman C, et al. Short-term consumption of probiotic lactobacilli has no effect on acid production of supragingival plaque. *Clin Oral Investig*. 2012;16(3):797-803.
108. Stensson M, Koch G, Coric S, Abrahamsson T, Jenmalm M, Birkhed D, et al. Oral Administration of *Lactobacillus reuteri* during the First Year of Life Reduces Caries Prevalence in the Primary Dentition at 9 Years of Age. *Caries Res*. 2013;48(2):111-7.
109. Ahola A, Yli-Knuuttila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlström A, Meurman JH, et al. Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Arch Oral Biol*. 2002;47(11):799-804.
110. Montalto M, Vastola M, Marigo L, Covino M, Graziosetto R, Curigliano V, et al. Probiotic treatment increases salivary counts of lactobacilli: a double-blind, randomized, controlled study. *Digestion*. 2004;69(1):53-6.
111. Keller MK, Twetman S. Acid production in dental plaque after exposure to probiotic bacteria. *BMC oral health*. 2012; 12(1):44.
112. Hasslof P, West CE, Videhult FK, Brandelius C, Stecksén-Blicks C. Early intervention with probiotic *Lactobacillus paracasei* F19 has no long-term effect on caries experience. *Caries Res*. 2013; 47(6):559-65.
113. Cogulu D, Topaloglu-Ak A, Caglar E, Sandalli N, Karagozlu C, Ersin N, et al. Potential effects of a multistrain probiotic-kefir on salivary *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. *Journal of Dental Sciences*. 2010;5(3):144-9.

114. Allegra Raff R, Hunt LC. Probiotics for Periodontal Health: A Review of the Literature. *J Dent Hyg.* 2012 Spring;86(2):71-81
115. Llodra Calvo J. Encuesta de salud oral en España en 2010. *Revista del Ilustre Consejo General de Colegio de Odontólogos y Estomatólogos de España.* 2012;17(1):13.
116. American Academy of Microbiology. Antibiotic Resistance: An Ecological Perspective on an Old Problem. Report of a colloquium, 12 to 14 October 2008; 2009.
117. How it works. Oragenics [Internet]; 2014. Available from: <http://www.oragenics.com/probiotics/evorapro-dental-professionals/how-it-works>.
118. About Biogaia [Internet]; 2009. Available from: [www.biogaia.com/about-biogaia](http://www.biogaia.com/about-biogaia).
119. For dental Professionals [Internet]; 2009. Available from: <http://commerce.jbutler.com/dentalprofessionals.aspx>.
120. 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.* 2009;67(1):19-24.
121. Campus G, Cocco F, Carta G, Cagetti MG, Simark-Mattson C, Strohmenger L, et al. Effect of a daily dose of *Lactobacillus brevis* CD2 lozenges in high caries risk schoolchildren. *Clin Oral Investig.* 2014;18(2):555-61.
122. Mayanagi G, Kimura M, Nakaya S, Hirata H, Sakamoto M, Benno Y, et al. Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets on periodontopathic bacteria: a double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2009;36(6):506-13.
123. Shimauchi H, Mayanagi G, Nakaya S, Minamibuchi M, Ito Y, Yamaki K, et al. Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Periodontol.* 2008;35(10):897-905.
124. Ishikawa H, Aiba Y, Nakanishi M, Yoshitami O, Koga Y. Suppression of periodontal pathogenic bacteria in the saliva of humans by the administration of *Lactobacillus salivarius* TI 2711. *日本歯周病学会会誌.* 2003;45(1):105-12.
125. Slawik S, Staufenbiel I, Schilke R, Nicksch S, Weinspach K, Stiesch M, et al. Probiotics affect the clinical inflammatory parameters of experimental gingivitis in humans. *Eur J Clin Nutr.* 2011;65(7):857-63.
126. Staab B, Eick S, Knöfler G, Jentsch H. The influence of a probiotic milk drink on the development of gingivitis: a pilot study. *J Clin Periodontol.* 2009;36(10):850-6.
127. Iniesta M, Herrera D, Montero E, Zurbriggen M, Matos AR, Marín MJ, 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. *J Clin Periodontol.* 2012;39(8):736-44.
128. Agulló MA, Loscos FG, Sanchis MC, Cabanell PI. Importancia del uso de índices en la práctica periodontal diaria del higienista dental. *Periodoncia: Sociedad Española de Periodoncia.* 2003;13(3):233-44.

129. Singh R, Damle SG, Chawla A. Salivary mutans streptococci and lactobacilli modulations in young children on consumption of probiotic ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb12 and *Lactobacillus acidophilus* La5. *Acta Odontol Scand.* 2011;69(6):389-94.
130. Tinanoff N, Palmer CA. Dietary determinants of dental caries and dietary recommendations for preschool children. *J Public Health Dent.* 2000;60(3):197-206.
131. Chávez Vereau N, Alarcón Palacios M. Enfermedad gingival en adolescentes: Diagnóstico y tratamiento. *Rev.estomatol.Hered.* 2012 22(3):167-70.
132. Manuel J. Encuesta sobre hábitos higiénicos orales en la población adolescente de la Comunidad Valenciana (2004). *RCOE.* 2006;11(2):195-201.
133. de Dios JG, García EM, Pastor EO, de la Gala, C Quesada, Gómez RG, Vera MC, et al. Estudio de hábitos de higiene bucodental en preadolescentes y adolescentes de dos colegios urbanos y dos rurales. *An Esp Pediatr.* 1996;45:14-20.
134. Chinnappa A, Konde H, Konde S, Raj S, Beena JP. Probiotics for future caries control: a short-term clinical study. *Indian J Dent Res.* 2013 Sep-Oct;24(5):547-9.

# **ANEXOS**

**Universidad Cardenal Herrera**



*Estimado director:*

El dentista tiene un papel crucial para enseñar a los niños y jóvenes cómo cuidar sus dientes. Junto a las revisiones dentales regulares y consejos sobre una buena higiene bucal, padres e hijos necesitan comprender la importancia, de una dieta sana desde una edad temprana. Diversos estudios demuestran como la ingesta de probióticos puede incluirse como una estrategia más en el cuidado de la salud bucodental.

Desde la Facultad de Odontología de la Universidad Cardenal Herrera-CEU estamos investigando para reafirmar estudios importantes desarrollados en países como Dinamarca, Suecia y Turquía. Estos estudios demuestran como la ingesta de probióticos contribuye a la prevención de la caries dental y de la gingivitis. Por tanto, el estudio se basará en la ingesta de un comprimido de probiótico diario durante 28 días. Durante este periodo la investigadora deberá realizar registros de muestras de saliva durante 4 días (en condiciones basales, a los 15, 28 y 45 días) para demostrar que disminuye la concentración de los *Streptococcus mutans*, microorganismos responsables en el desarrollo de la caries dental. De este modo, antes de realizar el estudio se llevará a cabo una revisión dental y una limpieza gratuita a todos los participantes del mismo.

Una vez finalizado el estudio, desde la Facultad de Odontología de la Universidad Cardenal Herrera-CEU nos comprometemos a enviar los resultados, así como los artículos previstos para publicarse en revistas científicas a nivel nacional e internacional.

Agradeciendo de antemano su colaboración le saluda atentamente,

Dra. Carla Borrell García

Profesora asociada de odontología de la Universidad Cardenal Herrera-Ceu.  
Colaboradora del Máster de odontopediatría.

## ANEXO 2

## Universidad Cardenal Herrera

*Apreciados padres:*

El dentista tiene un papel crucial para enseñar a los niños y jóvenes cómo cuidar sus dientes. Junto a las revisiones dentales regulares y consejos sobre una buena higiene bucal, padres e hijos necesitan comprender la importancia de una dieta sana desde una edad temprana. Diversos estudios demuestran cómo la ingesta de probióticos puede incluirse como una estrategia más en el cuidado de la salud bucodental.

Desde la Facultad de Odontología de la Universidad Cardenal Herrera-CEU estamos investigando para reafirmar estudios importantes desarrollados en países como Dinamarca, Suecia y Turquía. Estos estudios demuestran como la ingesta de probióticos contribuye a la prevención de la caries dental y de la gingivitis. Por tanto, el estudio se basará en la ingesta de un comprimido de probiótico diario durante 28 días. Durante este periodo la investigadora deberá realizar registros de muestras de saliva durante 4 días (en condiciones basales, a los 15, a los 28 y a los 45 días) para demostrar que disminuye la concentración de los *Streptococcus mutans*, microorganismos responsables en el desarrollo de la caries dental. De este modo, antes de realizar el estudio se procederá a llevar a cabo una revisión dental y una limpieza gratuita a todos los participantes del mismo.

Una vez finalizado el estudio, desde la Facultad de Odontología de la Universidad Cardenal Herrera-CEU nos comprometemos a enviar los resultados, así como los artículos previstos para publicarse en revistas científicas a nivel nacional e internacional.

Agradeciendo de antemano su colaboración les saluda atentamente,

Dra. Carla Borrell García  
Profesora asociada de odontología de la Universidad Cardenal Herrera-Ceu. Colaboradora del Máster de odontopediatría.

**¡ATENCIÓN! Si su hijo/a cumple alguno de los puntos abajo mencionados no podrá participar en el estudio.**

- Tomar alguna medicación que se asocie con alteración salivar.
- Niños portadores de aparatología de ortodoncia.
- Aplicaciones de flúor en el último mes.
- Consumo habitual de probióticos o chicles de xilitol.
- Antibióticos en los últimos 6 meses.
- Niños que presenten algún tipo de patología de tipo psicológico.
- Alteraciones de la marcha y/o síndromes no identificados.

**AUTORIZACIÓN**

He leído el procedimiento descrito arriba. Voluntariamente doy mi consentimiento para que mi hijo/a participe en el estudio de la Dra. Carla Borrell García sobre la Influencia de los probióticos en las bacterias causantes de la caries dental y la gingivitis.

Don/Doña: \_\_\_\_\_  
con D.N.I.: \_\_\_\_\_, como Padre/Madre/Tutor  
de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Gandía, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

## ANEXO 2

## REVOCACIÓN

Don.....

*(Nombre y dos apellidos)*

De.....años de edad, con domicilio en.....

.....y D.N.I. nº.....

En calidad de.....

*(Representante legal, familiar o allegado)*

De.....

*(Nombre y dos apellidos del paciente)*

REVOCO el consentimiento prestado en fecha....., y no deseo proseguir

El estudio bajo mi absoluta responsabilidad, que doy con esta fecha por finalizado.

En..... A.....

*(lugar)*

*(Fecha)*

Fdo:

Fdo:

Fdo:

*Odontologo/Investigador*

*El paciente*

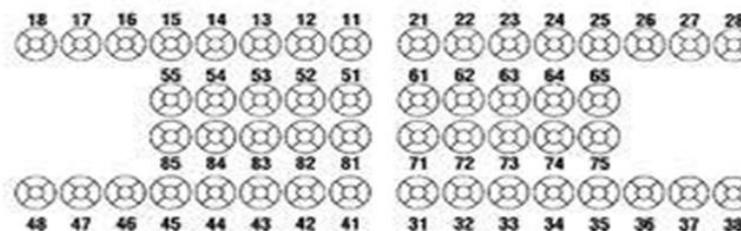
*El representante legal*

### ANEXO 3



**CEU**  
*Universidad  
 Cardenal Herrera*

Nombre:  
 Fecha de nacimiento:  
 Curso:



Empty rectangular box for patient information.

	V	M	D	L
16(55)				
21				
24(64)				
36(75)				
41				
44(84)				
Total:				

	V	M	D	L
16(55)				
21				
24(64)				
36(75)				
41				
44(84)				
Total:				

	V	M	D	L
16(55)				
21				
24(64)				
36(75)				
41				
44(84)				
Total:				

	V	M	D	L
16(55)				
21				
24(64)				
36(75)				
41				
44(84)				
Total:				

	V	M	D	L
16(55)				
21				
24(64)				
36(75)				
41				
44(84)				
Total:				

Fecha:

#### ÍNDICE DE PLACA DE SILNESS Y LÖE

Grado	Características
0	No hay placa
1	No hay placa a simple vista, si al paso del explorador.
2	Hay placa a simple vista.
3	Hay placa a simple vista y cálculo en el espacio interproximal.

	V	M	D	L
16(55)				
21				
24(64)				
36(75)				
41				
44(84)				
Total:				

**ANEXO 3**

	V	M	D	L
16				
21				
24				
36				
41				
44				
Total:				

	V	M	D	L
16				
21				
24				
36				
41				
44				
Total:				

	V	M	D	L
16				
21				
24				
36				
41				
44				
Total:				

	V	M	D	L
16				
21				
24				
36				
41				
44				
Total:				

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

	V	M	D	L
16				
21				
24				
36				
41				
44				
Total:				

	V	M	D	L
16				
21				
24				
36				
41				
44				
Total:				

**Índice gingival Silness y Løe**

Grado	Características
0	Ausencia de inflamación.
1	Inflamación leve: cambio de color y textura.
2	Inflamación moderada: enrojecimiento, edema, sangra al sondaje.
3	Inflamación severa: enrojecimiento, hipertrofia, sangrado espontáneo, ulceración.

\_\_\_\_\_

	V	M	D	L
16				
21				
24				
36				
41				
44				
Total:				

	V	M	D	L
16				
21				
24				
36				
41				
44				
Total:				

	V	M	D	L
16				
21				
24				
36				
41				
44				
Total:				

	V	M	D	L
16				
21				
24				
36				
41				
44				
Total:				

	V	M	D	L
16				
21				
24				
36				
41				
44				
Total:				

	V	M	D	L
16				
21				
24				
36				
41				
44				
Total:				

**Índice de hemorragia simplificado**

Grado:	Características
0	No hay sangrado al sondaje (esperar 10 segundos).
1	Hay sangrado al sondaje (esperar 10 segundos).

Ph: _____	Ph: _____
Fecha: _____	Fecha: _____
Ph: _____	Ph: _____

## ANEXO 4



## Encuesta

Nombre y apellidos:

Curso:

Redondea la respuesta que más se adecue.

1. ¿Picas entre horas? Si No
2. ¿Bebes refrescos a diario, tipo coca-cola, fanta, trinaranjus, acuarius...? Si No
3. ¿Tomas alimentos de consistencia pegajosa (p.ej. gominolas)? Si No
4. ¿Con qué frecuencia comes golosinas?  
Nunca 1 ó 2 veces a la semana Todos los días
5. ¿Con qué frecuencia comes pescado?  
Nunca 1 ó 2 veces a la semana 3 o más veces a la semana
6. ¿Con qué frecuencia comes fruta?  
Todos los días 1 ó 2 veces a la semana Nunca
7. ¿Con qué frecuencia comes verdura?  
Nunca 1 ó 2 veces a la semana Todos los días
8. ¿Sueles acompañar las comidas con ketchup, mayonesa u otro tipo de salsa? Si No
9. ¿Con qué frecuencia comes patatas fritas?  
Nunca 1 ó 2 veces por semana Más de 3 veces a la semana
10. ¿Sueles comer comida a la plancha? Sí No
11. ¿Sueles comer comida frita o rebozada? Sí No
12. ¿Con qué frecuencia tomas lácteos (yogures, actimel® o similares, queso...)?  
Nunca 1 ó 2 veces a la semana Todos los días
13. ¿Sueles desayunar leche con cola-cao o similares y bollería? Si No
14. ¿Desayunas tostadas con mermelada y mantequilla? Si No
15. ¿Desayunas leche con cereales? Si No
16. ¿Desayunas una tostada con aceite? Si No
17. ¿Con qué frecuencia bebes zumo?  
Nunca 1 ó dos veces a la semana Más de 3 veces a la semana
18. ¿Meriendas bollería? Si No
19. ¿Almuerzas (a media mañana) un bocata? Si No
20. ¿Almuerzas (a media mañana) bollería? Si No
21. ¿Meriendas un bocata? Si No
22. ¿Te cepillas los dientes después de todas las comidas? Si No
23. ¿Con qué frecuencia comes "comida basura"?  
Nunca 1 ó 2 veces a la semana Más de 3 veces a la semana
24. ¿Utilizas enjuagues con flúor? Si No
25. ¿Utilizas la seda dental? Si No
26. ¿Te sangran las encías cuando te cepillas los dientes? Si No
27. ¿Con qué frecuencia te cepillas los dientes?  
Nunca 1 vez al día 2 ó 3 veces al día
28. ¿Visitas al dentista 1 o más veces al año? Si No
29. ¿Te han hecho alguna vez una limpieza bucal? Si No
30. ¿Has tenido alguna vez una caries? Si No
31. ¿Vas al dentista a que te haga una limpieza bucal una vez cada año o cada dos años? Si No



**CEU**  
*Universidad  
Cardenal Herrera*

*Vicerrectorado de Investigación y  
Relaciones Internacionales*

La COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA de la Universidad CEU Cardenal Herrera, con domicilio en el Edificio Seminario, s/n, 46.113 – Moncada (Valencia)

#### INFORMA

La viabilidad del trabajo de Investigación en todos sus términos, cuya Investigadora Principal es la **Dra. Dña. Marta Ribelles Llop** con el título “Efectos de tabletas de probióticos sobre el PH, capacidad buffer, streptococcus mutans y lactobacillus acidophilus salivares y placa bacteriana, índice de hemorragia e índice gingival en niños de 12-17 años valencianos (España)”.

Y para que conste donde convenga y proceda y a petición del interesado expido la presente, en la ciudad de Moncada, a 16 de noviembre de 2012.

Fdo.: Iñaki Bilbao Estrada

Vicerrector de Investigación y RR.II.