



Efectos clínicos y microbiológicos del uso adicional
de probióticos en el tratamiento de la gingivitis:
un ensayo clínico aleatorizado controlado

Departamento de Estomatología III

Universidad Complutense de Madrid

Trabajo Fin del Master en Ciencias Odontológicas

*Tutor: David Herrera González
Candidato: Andrea Di Nunzio*

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. HIPÓTESIS.....	6
3. OBJETIVOS.....	6
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
4.1 Diseño del estudio.....	7
4.2 Tratamientos.....	8
4.3 Variables respuesta: parámetros clínicos.....	8
4.4 Variables respuesta: parámetros microbiológicos.....	9
4.5 Evaluación del cumplimiento y seguridad.....	10
4.6 Análisis de datos.....	10
5. RESULTADOS.....	11
5.1 Población del estudio.....	11
5.2 Resultados clínicos.....	11
5.3 Parámetros microbiológicos.....	12
5.4 Correlación entre variables clínicas y microbiológicas.....	12
5.5 Cumplimiento y efectos adversos.....	13
6. DISCUSIÓN.....	14
7. CONCLUSIONES.....	16
8. BIBLIOGRAFÍA.....	26

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la eficacia de un producto probiótico en la reducción de la gingivitis y su impacto sobre la microbiota subgingival.

Material y métodos: Se realizó un ensayo clínico aleatorizado controlado en 56 sujetos durante 6 semanas. Los sujetos se asignaron aleatoriamente a un grupo test, tratado con comprimidos que contenían las cepas probióticas *Lactobacillus plantarum* CECT 7481 (AB15), *Lactobacillus brevis* CECT 7480 (AB38) y *Pediococcus acidilactici* CECT 8633 (AB30), y a un grupo control, tratado con placebo. La variable respuesta primaria fue la variación del índice gingival (GI). Las muestras subgingivales se analizaron para cinco patógenos periodontales, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR). Se realizaron comparaciones intra- e intergrupo entre las variables clínicas y microbiológicas y se efectuó un análisis de regresión múltiple.

Resultados: En ambos grupos se observó una mejoría clínica significativa, sin embargo, no se detectaron diferencias intergrupo en cuanto a valores promedios de GI, índice de placa (PII) o índice de sangrado angulado (AngBS). El grupo test experimentó una reducción significativamente más alta de las localizaciones asociadas a GI=3 en el día 0. Las muestras subgingivales revelaron una reducción significativa de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en los dos grupos, mientras que sólo en el grupo test se observó una reducción significativa de *Tannerella forsythia*.

Conclusiones: Los comprimidos con *L. plantarum* CECT7481, *L. brevis* CECT7480 y *P. acidilactici* CECT8633 redujeron el número de localizaciones con inflamación severa en pacientes con gingivitis, tras una profilaxis profesional. Además, el uso adicional de los probióticos reveló un impacto microbiológico significativo, reduciendo los recuentos de *T. forsythia*.

1. INTRODUCCIÓN

La gingivitis está caracterizada por enrojecimiento, inflamación y sangrado de la encía; está causada por la acumulación de bacterias en el surco gingival, la cual causa una reacción inflamatoria de los tejidos gingivales asociada a un cambio en las especies microbianas residentes en el biofilm dental (Park y cols. 2015). Éste estado representa una de las enfermedades más prevalentes del ser humano (Albandar y Rams 2002). A pesar de que no todos los pacientes con gingivitis evolucionan a periodontitis, el manejo de la gingivitis es una estrategia crítica de prevención tanto primaria como secundaria de la periodontitis (Chapple et cols. 2015).

La eliminación mecánica regular del biofilm dental a través de prácticas de higiene oral adecuadas, junto con los procedimientos llevados a cabo por el profesional para eliminar el biofilm dental y los factores retentivos (como el cálculo dental, restauraciones inadecuadas o factores anatómicos) representan el primer eslabón en el tratamiento de la gingivitis (Lang 2014). Desafortunadamente, un gran número de individuos es incapaz de llevar a cabo un control adecuado de su propio biofilm supragingival (Van der Weijden y Hioe 2005); y otros factores dependientes de cada individuo además de la acumulación de placa, como el hábito de fumar, estados hormonales endocrinos, medicamentos o enfermedades sistémicas pueden modular la respuesta inflamatoria a la placa y conferir así una susceptibilidad alterada a la gingivitis (Tatakis y Trombelli 2004). En esos sujetos, se ha recomendado el uso adicional de agentes microbianos (control químico de la placa). Sin embargo, sus efectos adversos y las limitaciones asociadas a su uso han fomentado la búsqueda de enfoques alternativos (Wu y Savitt 2002).

Uno de estos enfoques alternativos ha sido el uso de probióticos, siendo éstos microorganismos vivos que, administrados oralmente en cantidades adecuadas, pueden modificar la flora comensal y prevenir así el cambio microbiológico y la colonización por parte de patógenos asociados a la inflamación gingival.

Los probióticos pueden intervenir en distintos procesos metabólicos mediante su capacidad enzimática, la modulación de la microbiota intestinal o la inhibición de patógenos, actuando sobre la propia actividad metabólica del individuo. Otros probióticos aumentan la resistencia a la colonización al competir con los microorganismos patógenos por los sitios de unión en el endotelio intestinal y por los nutrientes que requieren para sobrevivir y desarrollarse.

El uso de probióticos encuentra su mayor aplicación en los trastornos asociados al tracto digestivo. El uso de probióticos en personas intolerantes a la lactosa reduce los síntomas de inflamación o hinchazón, debido a la presencia de la lactasa en las bacterias ácido lácticas, mejorando así la digestión de la lactosa. Sin embargo, existe una amplia variedad en la actividad de lactasa de los diferentes probióticos. Numerosos estudios demuestran que la adición de distintas cepas de probióticos a bebidas lácteas puede contribuir a disminuir el estreñimiento (Camilleri y cols. 2007). De forma parecida, algunos de los mecanismos de acción de los probióticos, como la producción de sustancias antimicrobianas (bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y biosurfactantes) y la disminución del pH intestinal por el estímulo de organismos productores de ácido láctico, favorecen el crecimiento de organismos más benéficos, modulando la aparición de episodios intestinales adversos (diarreas). Diferentes estudios clínicos aleatorizados, tanto en niños como en adultos, han revelado efectos significativos sobre la frecuencia y severidad del dolor en el síndrome del intestino irritable (SII), una de las patologías gastrointestinales más comunes. (Horvath y cols. 2011).

Se han documentado efectos benéficos sobre el nivel de lípidos tras el consumo de productos fermentados y adicionados con probióticos. Los mecanismos por los cuales disminuyen el colesterol sérico no son claros. Algunos estudios lo atribuyen a su habilidad de suprimir la reabsorción de ácidos biliares en la circulación entero-hepática y aumentar la excreción de esteroides ácidos en heces (Usman y cols. 2000, Ramasamy y cols. 2010). Igualmente, los probióticos pueden unirse a la molécula de colesterol en el intestino delgado, habilidad cepa específica, o convertir el colesterol a coprostanol en el intestino para ser excretado directamente en las heces, permitiendo por un proceso de homeostasis la reducción del colesterol sanguíneo (Kimoto y cols. 2002, Lye y cols. 2010).

Dadas sus propiedades inmuno-moduladoras, se ha considerado la posibilidad del uso de los probióticos para la prevención y/o tratamiento de alergias. Las investigaciones en gestantes han indicado que pueden aumentar el potencial inmunológico de la leche materna y disminuir la sensibilización a alergias. Al contrario de lo que se ha observado en su uso terapéutico, los probióticos han mostrado un mejor comportamiento en la prevención de las alergias.

Los microorganismos probióticos también pueden desarrollar un papel importante a nivel odontopediátrico como, por ejemplo, la disminución en el recuento salival de *S. mutans* y *Lactobacillus*. Algunos son capaces de incorporarse a la película adquirida y crecer junto a la flora autóctona de la placa supragingival, a la vez que disminuyen la colonización de microorganismos cariogénicos.

Además, los probióticos también pueden beneficiar la salud oral modulando la inmunidad de la mucosa en la cavidad oral (Teughels y cols. 2011). Varios estudios han evaluado el efecto de las diferentes cepas de probióticos sobre la inflamación gingival, reportando resultados conflictivos, y demostrando que, a pesar de que una cepa específica puede ejercer un efecto benéfico a favor de la salud general, no todos los probióticos pueden ser útiles para la prevención y el tratamiento de la gingivitis (Krasse y cols. 2006, Staab y cols. 2009, Iniesta y cols. 2012, Hallström y cols. 2013, Lee y cols. 2015).

Las cepas probióticas de uso oral deberían ser elegidas según su actividad antimicrobiana *in vitro* frente a los patógenos orales, la capacidad de adherirse a los tejidos orales, la tolerancia a factores de estrés del medio oral y varios aspectos de seguridad (como su perfil de resistencia antibiótica y la producción de ácido láctico). Las cepas *Lactobacillus plantarum* CECT 7481 (AB15), *Lactobacillus brevis* CECT 7480 (AB38) y *Pediococcus acidilactici* CECT 8633 (AB30) han revelado *in vitro* una actividad frente a *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, y *Fusobacterium nucleatum* y la capacidad de colonizar la cavidad oral (Bosch y cols. 2012). Sin embargo, su eficacia clínica en reducir la inflamación gingival no ha sido demostrada *in vivo*. En consecuencia, el objetivo de este ensayo clínico fue evaluar la eficacia de una formulación probiótica específica, suministrada por vía oral, en reducir la gingivitis y evaluar su impacto en la microbiota subgingival.

2. HIPÓTESIS

La hipótesis nula del estudio es:

“El uso de probióticos, como coadyuvantes a la profilaxis profesional, no produce ningún cambio en los parámetros evaluados, por lo tanto, no tiene algún efecto en el tratamiento de la gingivitis”.

3. OBJETIVOS

Objetivo primario

El objetivo primario del estudio fue evaluar si el producto probiótico evaluado tiene efecto sobre la gingivitis, evaluada mediante el índice gingival (GI).

Objetivos secundarios

Evaluar la seguridad y tolerabilidad del producto suministrado y determinar su eficacia en la modificación de otros parámetros asociados a la gingivitis. Estos parámetros incluyen el índice de placa (PII) y el índice de sangrado angulado (AngBS). También se evaluó el impacto de los probióticos en la composición de la microbiota subgingival.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Diseño del estudio

Se trata de un ensayo clínico aleatorizado controlado, doble ciego, con un diseño paralelo. El protocolo, el consentimiento informado y las hojas informativas de los pacientes fueron aprobadas por el comité ético de investigación (*Comité de Ensayos Clínicos del Hospital Universitario San Carlos, Madrid*). Los pacientes del estudio fueron reclutados en la Facultad de Odontología, Universidad Complutense, Madrid, España, entre febrero hasta noviembre 2015. Los sujetos candidatos a participar en el estudio fueron informados sobre las características del estudio y, en caso de participar en el estudio, firmaron un documento de consentimiento informado, también aprobado por el Comité Ético. Los criterios de selección se describen a continuación:

Criterios de inclusión

- 18-55 años de edad.
- Varón o hembra (grupos equilibrados).
- No fumadores (pacientes que nunca han fumado o exfumadores desde hace al menos 6 meses).
- Sujetos con gingivitis natural definida por un índice gingival (GI) promedio > 1.3.
- Sin pérdida de inserción interproximal > 2mm en la mayoría de las localizaciones.

Criterios de exclusión

- Lesiones cariosas y/o restauraciones inadecuadas.
- Sujetos sometidos a tratamientos odontológicos.
- Sujetos sometidos a terapia ortodóntica o portadores de férula de descarga.
- Sujetos padeciendo alguna enfermedad sistémica o condición que pudiera afectar la respuesta de los tejidos gingivales o la posibilidad de llevar a cabo un control de placa adecuado (embarazo, diabetes, defectos cuantitativos y/o cualitativos de células polimorfonucleares, otros desórdenes del sistema inmune, etc.).
- Sujetos tomando medicamentos que puedan interferir con la respuesta gingival (antiinflamatorios, difenilhidantoína, bloqueadores de canales de calcio, ciclosporina A, inmunoestimuladores/inmunomodificadores).

- Sujetos que hubieran estado tomando antibióticos o antisépticos en los 2 meses previos al estudio
- Sujetos que hubieran estado usando productos probióticos para la higiene oral en los 2 meses previos al estudio
- Antecedentes de hipersensibilidad o alergia a cualquiera de los componentes de los productos de tratamiento.

4.2 Tratamientos

En el día 0, los pacientes recibieron una profilaxis oral profesional (eliminación mecánica profesional de la placa y cálculo supragingival junto con “desbridamiento” hasta el fondo del surco/bolsa) e instrucciones estandarizada de higiene oral, con un cepillado con una pasta dentífrica fluorada dos veces al día. Se prohibió el uso de enjuagues orales.

A continuación, los sujetos del estudio fueron asignados de forma aleatoria a uno de los dos posibles tratamientos:

- TEST (Probióticos): los comprimidos contenían las cepas probióticas *Lactobacillus brevis* CECT-7480 (AB15), *Lactobacillus plantarum* CECT-7481 (AB38) y *Pediococcus acidilactici* CECT-8633 (AB30) (dosis por toma 1.00×10^9 unidades formadoras de colonia [UFC]).
- CONTROL (Placebo): comprimidos conteniendo los mismos excipientes del producto activo, pero sin bacterias vivas.

Cada sujeto fue instruido en mascar 2 comprimidos al día. Tanto los comprimidos como las cajas tenían el mismo aspecto y estaban numeradas según un listado aleatorizado, generado por ordenador y revelado sólo al final del estudio, o en el caso de que ocurriese algún efecto adverso relevante.

4.3 Variables respuesta: parámetros clínicos

Las variables clínicas fueron evaluadas al día 0 y a las 6 semanas. La primera variable analizada fue el índice Gingival (GI), según la modificación de Trombelli y cols. (2004) del índice de Løe y Silness (1963). El índice de Placa (PII) fue evaluado según la modificación de Furuichi y cols. (1992) del índice de placa de Silness y Løe (1964), que consiste en el uso de una solución relevadora para distinguir los valores 0 y 1 del PII. El sangrado fue evaluado a través el índice de sangrado angulado (AngBS; Trombelli y cols. 2004), que es una modificación del índice de

sangrado angulado reportado por Van der Weijden y cols. (1994). Tras haber secado suavemente la encía con aire comprimido, se introdujo una sonda periodontal (PCP 15, Hu-Friedy, Chicago, IL, EE.UU.) en el surco gingival con una angulación de 60° con respecto al eje longitudinal del diente, en contacto con la encía, pero sin recorrer el margen gingival. Todos los índices han sido evaluados por dos examinadores calibrados y entrenados (EM para GI, MI para PII y AngBS).

4.4 Variables respuesta: parámetros microbiológicos

Tanto en el día 0 como a las 6 semanas, e inmediatamente antes de comenzar el examen clínico, se tomaron muestras de placa subgingival, una en cada cuadrante seleccionado (maxilar superior izquierdo / mandibular inferior derecho). La placa subgingival se obtuvo mediante puntas de papel estériles mantenidas en el surco durante 10 segundos. Las muestras fueron agrupadas en el mismo vial y transferidas a tubos Eppendorf de microcentrífuga estériles y almacenados a -20°C hasta su análisis. El ADN bacteriano fue aislado de las muestras mediante el uso de un kit comercial (MolYsis Complete5; Molzym GmbH & CoKG, Bremen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante, con detección y cuantificación a través del método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con cuantificación (qPCR).

La amplificación de la qPCR se realizó basándose en el uso de sondas Taqman con cebadores específicos para cinco patógenos periodontales (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*) marcados frente al gen 16S del rARN [obtenido a través de “Life Technologies Initrogen” (Carlsbad, CA, EE.UU.) y “Applied Biosystems” (Carlsbad, CA, EE.UU.)].

Cada muestra de ADN fue analizada por duplicado. Los valores de la cuantificación de ciclo (Cq), que describen el número de ciclo de PCR en el cual la fluorescencia crece por encima del punto 0, han sido determinados con el paquete de software (LC 480 Software 1.5; Roche Diagnostic GmbH; Mannheim, Alemania). La cuantificación de células viables con la qPCR se basó en las curvas estándar, siguiendo un protocolo establecido (Sánchez y cols. 2014). La correlación entre los valores de Cq y UFC/mL se ha generado automáticamente a través del software mencionado (LC 480 Software 1.5; Roche). Todos los ensayos se llevaron a cabo con un rango de detección cuantitativo lineal establecido por un intervalo de pendientes de 3.3-3.6 ciclos/logaritmos en base 10, $r^2 > 0.997$ y un rango de eficiencia de 1.9–2.0. Se han tomado medidas para evitar AND de arrastre. No obstante, cuando el NTC era detectable, el límite de la detección se establecía en el último valor de la curva estándar que soporta cinco ciclos de diferencia con NTC.

4.5 Evaluación del cumplimiento y seguridad

Se les pidió a los pacientes que confirmasen la toma de los comprimidos asignados, rellenando diariamente un cuestionario de cumplimiento con el protocolo. Este fue devuelto a los examinadores, conjuntamente con las cajas de los comprimidos no consumidos. Cualquier efecto adverso (signo, síntoma, enfermedad, valor de laboratorio anormal u otro evento médico) padecido por un sujeto del estudio o detectado por el examinador, independientemente de su relación con el estudio, fue registrado, incluyendo informaciones sobre la naturaleza, severidad, tiempo de presentación y duración del efecto adverso, así como las medidas requeridas para su tratamiento (si este fue necesario), la posible asociación con el estudio y otras informaciones relevantes.

4.6 Análisis de datos

El tamaño muestral se ha calculado usando GI como variable respuesta primaria, asumiendo una diferencia entre grupos del 25% con una desviación estándar de 0.43 (Iniesta y cols. 2012) con un poder estadístico del 85% (error tipo $\beta = 0.15$) y un error $\alpha = 0.05$. Con esos valores, el cálculo del tamaño muestral ha requerido un total de 56 sujetos (28 por grupo), teniendo en cuenta un posible 10% de abandonos.

La variable primaria y las variables secundarias (tanto clínicas como microbiológicas) se han analizado usando el software "Statistical Analysis Software" (SAS; Cary, NC, EE.UU.) siguiendo el enfoque de intención de tratar (se procesaron todos los datos disponibles de todos los sujetos, independientemente de si abandonaban o no el estudio).

Los cambios en la variable primaria y en las variables secundarias clínicas entre los grupos se compararon con la T de Student, después de ajustar la normalidad de la distribución con el test de Shapiro-Wilk, seguidos por test post-hoc para evaluar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (test de los rangos múltiples de Duncan).

Por lo que concierne el análisis de las variables microbiológicas, a la hora de evaluar la cantidad de cada especie bacteriana, se ha aplicado el método Bonferroni-Holm para el ajuste de multiplicidad (teniendo en cuenta las cinco especies analizadas).

5. RESULTADOS

5.1 Población del estudio

Finalmente, la población del estudio incluyó 59 pacientes (edad 31.7 ± 12.8 años; 61%/39% hembra/varón), 30 de los cuales fueron asignados al grupo de probióticos y 29 al grupo placebo. El diagrama de flujo (Figura 1) representa la asignación de los pacientes a los grupos del estudio. Un sujeto en el grupo test y 6 en el grupo control abandonaron el estudio. La Tabla T1 refleja las características de los sujetos en el día 0. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la edad o el sexo entre los grupos.

5.2 Resultados clínicos

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el GI entre los dos grupos en el día 0 ($p=0.6525$) ni en la 6ª semana ($p=0.3470$). El GI se redujo significativamente a las 6 semanas desde el día 0, en $-1.06 (\pm 0.3)$ en el grupo test ($p<0.0001$) y en $-1.08 (\pm 0.3)$ puntos en el grupo control ($p<0.0001$). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al cambio basal-final en GI entre los dos grupos (diferencia [dif] 0.05, intervalo de confianza al 95% [CI] $(-0.1, 0.2)$, $p=0.4806$) (Tabla 1).

La Tabla 2 refleja la frecuencia de distribución de las localizaciones con distintos grados de gingivitis en las dos visitas. En el día 0, el número de localizaciones con GI = 3 era de 401 (6.3% del total). El número era más alto en el grupo test que en el grupo control ($n=263$ (8.2%) vs $n=138$ (4.4%), $p<0.0001$). A la 6ª semana, el número de localizaciones con GI = 3 era de 5 (0.1% del total). El número era más bajo en el grupo de probióticos que en el control ($n=0$ (0.0%) vs $n=5$ (0.2%), $p=0.0418$). Además, ningún sujeto del grupo test presentaba gingivitis a las 6 semanas ($GI>1$), frente a 3 del grupo control (13%, $p=0.0801$).

La Tabla 3 recoge los valores relativos al PII. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el PII entre los grupos en el día 0 ($p=0.3846$) o a las 6 semanas ($p=0.0594$). El PII se redujo significativamente a las 6 semanas desde el día 0 en ambos grupos, en $-0.39 (\pm 0.3)$ puntos en el grupo test ($p<0.0001$) y en $-0.44 (\pm 0.3)$ en el grupo control ($p<0.001$). En cuanto a los cambios de PII, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos a las 6 semanas desde el día 0 (dif 0.10, $(-0.0, 0.2)$, $p=0.1808$).

No hubo diferencias significativas en el AngBS entre los grupos al día 0 ($p=0.9294$) o las 6 semanas ($p=0.0441$). El AngBS se redujo significativamente a la 6ª semana en ambos grupos, en $-0.20 (\pm 0.2)$ puntos en el grupo test ($p<0.0001$) y en $-0.28 (\pm 0.2)$ puntos en el grupo control ($p<0.001$). No se han detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en cuanto a cambio de AngBS a las 6 semanas desde al día 0 (dif 0.09, $(-0.0, 0.2)$, $p=0.0610$). (Tabla 4).

5.3 Resultados microbiológicos

La Tabla 5 refleja la prevalencia de las bacterias patógenas seleccionadas por grupos de tratamiento. La mayoría de los sujetos tenían los patógenos en las dos visitas en ambos grupos, sin diferencias, salvo para *A. actinomycetemcomitans*, que experimentó una reducción entre visitas (53.8% al día 0 vs 28.8% a las 6 semanas, Fisher test, $p=0.0164$). A la hora de dividir la muestra por grupos de tratamientos, la diferencia en los sujetos positivos para *A. actinomycetemcomitans* no era significativa, tanto en el grupo test como en el control, debido al tamaño reducido de la muestra.

En la Tabla 6 se explican las concentraciones de bacterias estudiadas, y las variaciones entre día 0 y la 6ª semana, según el grupo de tratamiento. Se observó una reducción significativa de *A. actinomycetemcomitans* en ambos grupos, mientras que la reducción de *T. forsythia* ha sido significativa sólo en el grupo de Probióticos.

5.4 Correlación entre variables clínicas y microbiológicas

El número de localizaciones asociadas a GI = 3 ha sido la variable clínica más relacionada con la concentración de todas las especies bacterianas, excepto con *P. gingivalis*. Solamente *A. actinomycetemcomitans* y *T. forsythia* revelaron una relación con el GI promedio tras aplicar múltiples test de ajustes (Tabla 7). Ni PII ni AngBS superaron los test de ajuste para la correlación.

Las concentraciones de *T. forsythia*, *F.nucleatum* y *C.rectus* estaban altamente relacionadas entre ellas ($\rho \geq 0.7$). *P. gingivalis* sólo reveló una correlación moderada con *T.forsythia*, *F.nucleatum* y *C.rectus*. Por el contrario, para *A.actinomycetemcomitans* no se encontró ninguna correlación con los otros patógenos. La correlación más alta se observó entre los dos miembros del complejo naranja (*F.nucleatum* y *C.rectus*) (Tabla S3).

En el análisis de regresión múltiple, tras un ajuste por visitas, *T. forsythia* reveló ser un predictor lineal significativo del número de puntuaciones individuales de GI = 3. De manera similar, solo

A. actinomycetemcomitans demostró ser un predictor lineal significativo del valor promedio de GI en el análisis de regresión múltiple tras el mismo ajuste.

5.5 Cumplimiento y efectos adversos

El 94.2% de los pacientes cumplió con, al menos, el 75% del tratamiento, el 89.7% de los pacientes en el grupo test y el 100% en el grupo control. No hubo diferencias significativas en el cumplimiento del tratamiento entre los dos grupos. De los 59 pacientes tratados, 5 indicaron tener, al menos, un efecto adverso (8.5%), 4 en el grupo test y 1 en el grupo control (13.3% vs 3.4%, $p=0.3533$), siendo el dolor abdominal el más frecuente. Ninguno de los pacientes refirió eventos adversos graves y sólo un paciente en el grupo control abandonó el tratamiento debido a un efecto adverso.

6. DISCUSIÓN

Los resultados de este ensayo clínico aleatorizado han revelado que el uso adicional de comprimidos probióticos contenientes las cepas *Lactobacillus plantarum* CECT 7481 (AB15), *Lactobacillus brevis* CECT 7480 (AB38) y *Pediococcus acidilactici* CECT 8633 (AB30) ha sido capaz de reducir la gingivitis tras recibir una profilaxis profesional. Considerando las variaciones en el GI promedio, tanto en el grupo test como en el control los sujetos experimentaron una mejoría estadísticamente significativa; sin embargo, las diferencias entre los grupos no reflejaron resultados significativos. Al valorar las localizaciones con un valor más alto de gingivitis (GI=3 al día 0), el tratamiento con comprimidos probióticos ha revelado una mayor reducción, estadísticamente significativa, en dichas localizaciones. Además, se pudo considerar que todos los pacientes en el grupo de probióticos habían alcanzado la salud gingival (identificada con un $GI < 1$) en la visita de reevaluación, mientras que 3 pacientes en el grupo control seguían presentando inflamación gingival “leve” (identificada con un $GI > 1$). A pesar de que el estudio no tuvo la potencia suficiente para identificar esta diferencia como estadísticamente significativa, ha revelado una tendencia a la significación estadística.

La decisión de utilizar al GI como variable respuesta primaria para evaluar la eficacia del uso adicional de nuevos agentes en el tratamiento de la gingivitis, como los probióticos, puede no ser la más apropiada. Como se ha demostrado en los resultados del estudio, el efecto de dilución de la situación más frecuente ($GI \leq 1$) puede enmascarar el efecto positivo del agente sobre las localizaciones con gingivitis clara ($GI \geq 2$). De hecho, al analizar las localizaciones asociadas a un grado más severo de gingivitis (GI=3), el efecto coadyuvante de los probióticos fue claramente significativo. La falta de significación estadística en la variable respuesta primaria (GI promedio) puede ser explicada también por la muestra poblacional (con gingivitis leve-moderada) y por el efecto de la profilaxis profesional, junto con el corto período de evaluación, que puede haber dificultado la evaluación apropiada del efecto real de los probióticos en los patrones de recolonización bacteriana. De hecho, otros estudios han encontrado resultados parecidos, con ausencia de significación estadística para el GI promedio, con cepas diferentes, como *Lactobacillus salivarius* WB21 o *Lactobacillus reuteri* (DSM-17938 and ATCC PTA D289) en los estudios de Shimauchi y cols. (2008) o Iniesta y cols. (2012), respectivamente. Otros estudios (Hallström y cols. 2013, Slawik y cols. 2011, Staab y cols. 2009) también encontraron resultados parecidos a la hora de evaluar el impacto de otras fórmulas probióticas en el tratamiento de la gingivitis experimental. Sólo hay un estudio evaluando los efectos de los probióticos, que encontró diferencias significativas en el GI promedio (Krasse y cols. 2006). Este estudio, sin

embargo, no demostró muestras comparables en la evaluación basal, ya que los valores de PII eran significativamente diferentes, y las diferencias intergrupo durante el seguimiento no se explicaban.

El presente estudio ha valorado también, en una población con gingivitis de “leve” a “moderada”, el impacto microbiológico sobre los patrones de recolonización de cinco patógenos periodontales tras 6 semanas de uso adicional de probióticos inmediatamente después de la profilaxis profesional. Aunque las cepas probióticas usadas no han sido capaces de prevenir totalmente la recolonización de los patógenos putativos, ya que la mayoría de los individuos albergaba esas especies tanto en el día 0 como en la visita de seguimiento, su concentración ha sido reducida significativamente en ambos grupos. El uso de comprimidos con probióticos se asoció a una reducción estadísticamente significativa de los niveles de *T. forsythia*, incluso aplicando los ajustes por comparaciones múltiples en el análisis estadístico. Se han encontrado resultados similares por parte de Mayanagi y cols. (2009), después del uso de *Lactobacillus salivarius* WB21 durante 8 semanas. *T. forsythia* es un miembro del complejo rojo, y una de las especies bacterianas más prevalentes en las muestras de placa subgingival en individuos con periodontitis (Socransky y Haffajee 2005, Tomita y cols. 2013, Wara-aswapati y cols. 2009). Además, ha sido asociado a una mayor severidad de la periodontitis y a una peor respuesta al tratamiento (Ready y cols. 2008, Lanza y cols. 2016). Las correlaciones significativas entre concentraciones de las bacterias analizadas y el número de superficies dentales asociadas a GI=3, específicamente las concentraciones de *T.forsythia* (coeficiente de correlación = 0.415, $p<0.0001$) resaltan el posible objetivo del uso coadyuvante de los probióticos en las localizaciones que alberguen varias especies patógenas, que tienen el grado más alto de inflamación gingival.

7. CONCLUSIONES

Dentro de las limitaciones de esta investigación, se puede concluir que los comprimidos probióticos con *Lactobacillus plantarum* CECT-7481, *Lactobacillus brevis* CECT-7480 y *Pediococcus acidilactici* CECT-8633, de manera coadyuvante a la higiene mecánica profesional y personal, son capaces de reducir el número de localizaciones con inflamación severa, comparados con placebo, en pacientes con gingivitis. El uso de probióticos también tuvo un impacto microbiológico significativo, ya que se asoció a una reducción en los recuentos de *T. forsythia*.

Fig.1 Diagrama de flujo de la inclusión de los pacientes y seguimiento

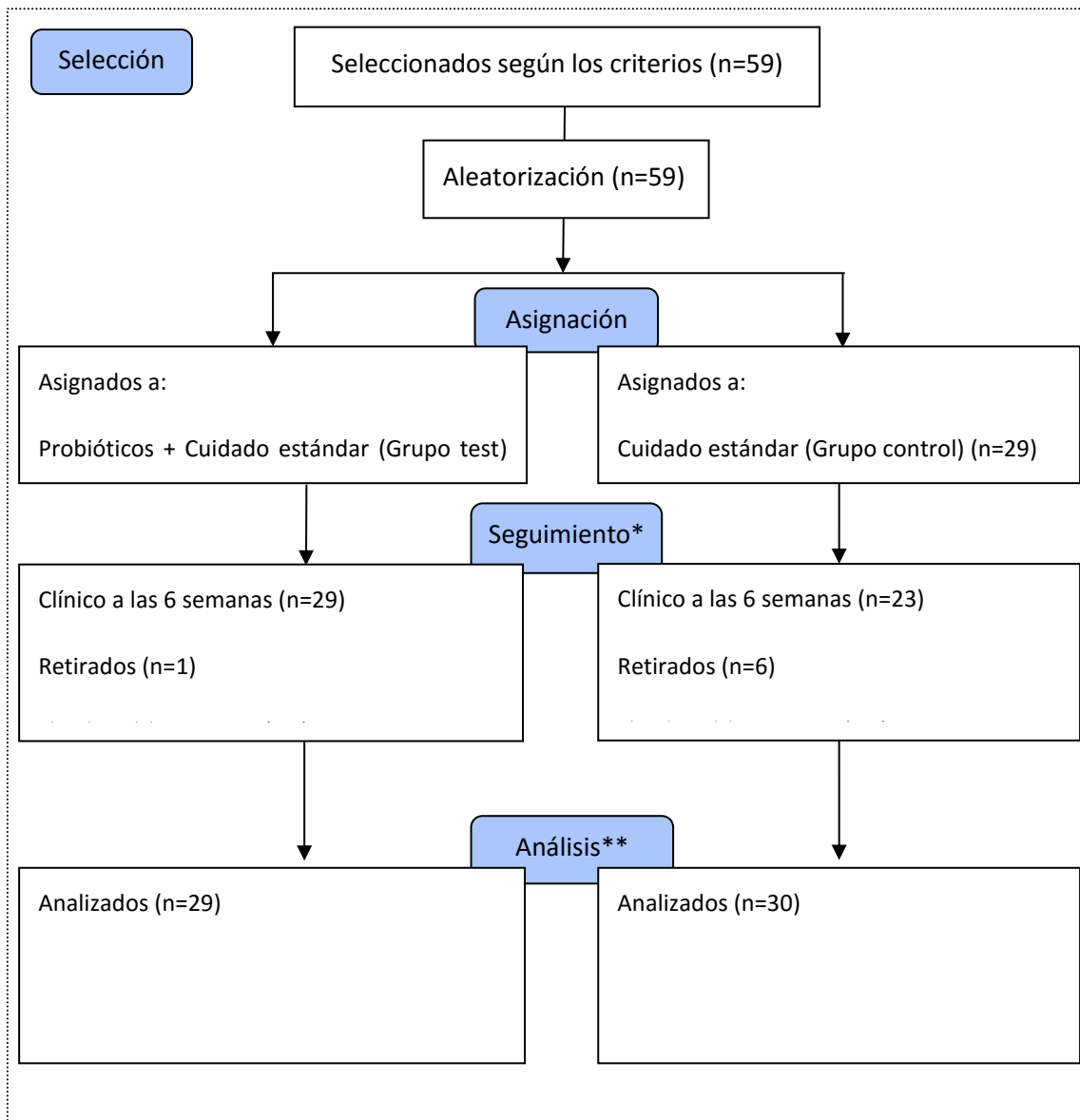


Tabla 1. Índice Gingival (GI) promedio, desviación estándar (DE) e intervalo de confianza (IC) al 95%, por visita, con comparación intergrupo mediante T de Student para muestras no pareadas.

Visita	Probióticos					Control					T-Student
	n	GI promedio	DE	IC 95%		n	GI promedio	DE	IC 95%		p
Día 0	30	1.65	0.3	1.5	1.8	29	1.62	0.2	1.5	1.7	0.652
Sem 6	29	0.60	0.2	0.5	0.7	23	0.54	0.3	0.4	0.7	0.347
Día0-sem6	29	-1.06	0.3	-1.2	-1.0	23	-1.08	0.3	-1.2	-1.0	0.480

Tabla 2. Número de localizaciones con GI=3, con comparación intergrupo con test del Chi cuadrado.

	Probióticos	Control	Chi cuadrado
	N=30	N=29	
Día 0			p
GI=3	263 (8.2%)	138 (4.4%)	<0.0001
GI<3	2937 (91.8%)	30034 (95.6%)	
Semana 6			
GI=3	0 (0.0%)	5 (0.2%)	0.0418
GI<3	3088 (100%)	2498 (98.8%)	
Variación			
GI=3 al día 0	263 (100%)	138 (96.5%)	0.0130
GI=3 a las 6 semanas	0 (0.0%)	5 (3.5%)	

Tabla 3. Índice de Placa (PII) promedio, desviación estándar (DE) e intervalo de confianza (IC) 95%, por visita, con comparación intergrupo mediante T de Student para muestras no pareadas.

Visita	Probióticos					Control					T-Student
	n	PII Promedio	DE	IC 95%		n	PII Promedio	DE	IC 95%		p
Día 0	30	1.60	0.2	1.5	1.7	29	1.55	0.2	1.5	1.6	0.384
Sem 6	29	1.22	0.2	1.1	1.3	23	1.08	0.3	0.9	1.2	0.059
Día0-Sem6	29	-0.39	0.3	-0.5	-0.3	23	-0.44	0.3	-0.6	-0.3	0.180

Tabla 4. Índice de Sangrado angulado (AngBS) promedio, desviación estándar (DE) e intervalo de confianza (IC) al 95%, por visita, con comparación intergrupo mediante T de Student para muestras no pareadas.

Visita	Probióticos					Control					T-Student
	n	AngBS Promedio	DE	IC 95%		n	AngBS Promedio	DE	IC 95%		p
Día 0	30	0.57	0.2	0.5	0.6	29	0.57	0.2	0.5	0.7	0.929
Sem6	29	0.38	0.2	0.3	0.5	23	0.29	0.2	0.2	0.4	0.044
Día0-Sem6	29	-0.20	0.2	-0.3	-0.1	23	-0.28	0.2	-0.4	-0.2	0.061

Tabla 5. Muestras subgingivales: media, desviación estándar (DE) e intervalo de confianza (IC) al 95% de UFC/mL transformadas logarítmicamente por visitas por especie seleccionada.

	Probióticos				Control			
	n	Media (DE)	IC 95%		n	Media (DE)	IC 95%	
<i>P.gingivalis</i>								
Día 0	28	2.61 (1.5)	2.0	3.2	23	3.02 (2.2)	2.1	4.0
Semana 6	28	2.24 (0.9)	1.9	2.6	23	2.44 (1.2)	1.9	2.9
Variación		-0.37 (1.2)	-0.9	0.1		-0.58 (2.0)	-3.9	2.6
<i>A.actinomycetemcomitans</i>								
Día 0	14	2.25 (1.3)	1.5	3.0	16	2.24 (1.0)	1.7	2.8
Semana 6	14	1.29 (1.6)	0.4	2.2	16	1.18 (1.3)	0.5	1.9
Variación		-0.97* (1.3)	-1.7	-0.2		-1.06* (1.3)	-1.7	-0.4
<i>F.nucleatum</i>								
Día 0	29	4.89 (0.7)	4.6	5.2	23	4.81 (0.8)	4.4	5.2
Semana 6	29	4.79 (0.6)	4.6	5.0	23	4.53 (0.8)	4.2	4.9
Variación		-0.10 (0.7)	-0.4	0.2		-0.28 (0.8)	-0.6	0.1
<i>T.forsythia</i>								
Día 0	28	4.40 (1.4)	3.9	4.9	21	4.04 (1.9)	3.2	4.9
Semana 6	28	3.34 (1.5)	2.8	3.9	21	3.53 (1.6)	2.8	4.3
Variación		-1.06*† (1.6)	-1.7	-0.4		-0.51 (2.0)	-1.4	0.4
<i>C.rectus</i>								
Día 0	29	3.31 (1.1)	2.9	3.7	23	3.23 (1.2)	2.7	3.8
Semana 6	29	3.32 (0.8)	3.0	3.6	23	2.61 (1.3)	2.0	3.2
Variación		0.01 (0.8)	-0.3	0.3		-0.63 (1.4)	-1.2	0.0

* Diferencia intragrupo con el día 0 con los ajustes menos estrictos, p<0.05

† Diferencia intragrupo con el día 0 con los ajustes más estrictos, p<0.05

Tabla 6. Correlación de especies individuales con puntuaciones individuales de GI=3 y GI promedio (GI)

Especies bacterianas	Localizaciones con GI=3		GI promedio	
	Coef. Spearman	p	Coef. Spearman	p
<i>P. gingivalis</i>	0.284	0.0038	0.053	0.5993
<i>A.actinomycetemcomitans</i>	0.303	0.0185*	0.392	0.0020*
<i>F. nucleatum</i>	0.330	0.0006*	0.176	0.0745
<i>T. forsythia</i>	0.415	<0.0001*	0.301	0.0026*
<i>C. rectus</i>	0.301	0.0019*	0.153	0.1218

* Correlación estadísticamente significativa

Tabla 7. Regresión lineal múltiple entre especies individuales, visitas y número localizaciones asociadas a GI=3

Modelo completo				
Coefficiente de Correlación Múltiple		0.508		
R2 (ajustado)		0.3215		
F-Fisher		4.03		
P		0.0022		
	Coefficientes	DE	t	P
Interceptación	7.069	12.966	0.55	0.5880
VISITA	-7.736	2.923	-2.65	0.0108
P.gingivalis	0.304	1.026	0.30	0.7679
A.actinomycetemcomitans	-0.723	1.054	-0.69	0.4954
F.nucleatum	-0.540	3.749	-0.14	0.8859
T.forsythia	2.284	1.239	1.84	0.0711
C.rectus	1.006	2.176	0.46	0.6458
Modelo optimizado (eliminación hacia atrás)				
Coefficiente de Correlación Múltiple		0.499		
R2 (ajustado)		0.259		
F-Fisher		16.58		
P		<0.0001		
	Coefficientes	DE	t	P
Interceptación	4.314	3.652	1.18	0.2405
VISITA	-5.418	1.658	-3.27	0.0015
T.forsythia	1.937	0.519	3.74	0.0003

Tabla 8. Regresión lineal múltiple entre especies individuales, visitas y valor promedio de GI.

Modelo completo				
Coefficiente de Correlación Múltiple		0,916		
R2 (ajustado)		0,829		
F-Fisher		89,22		
P		<0.0001		
	Coefficientes	DE	t	P
Interceptación	2,587	0,206	12,574	<0.0001
VISITA	-1,028	0,048	-21,450	<0.0001
P.gingivalis	-0,019	0,019	-1,030	0,3056
A.actinomycetemcomitans	0,042	0,019	2,262	0,0258
F.nucleatum	-0,018	0,056	-0,317	0,7522
T.forsythia	0,025	0,020	1,247	0,2152
C.rectus	0,020	0,035	0,557	0,5789
Modelo optimizado (eliminación hacia atrás)				
Coefficiente de Correlación Múltiple		0,913		
R2 (ajustado)		0,830		
F-Fisher		267,44		
P		<0.0001		
	Coefficientes	DE	t	P
Interceptación	2,618	0,078	33,565	<0.0001
VISITA	-1,039	0,047	-22,069	<0.0001
A.actinomycetemcomitans	0,047	0,018	2,647	0,0094

8. BIBLIOGRAFÍA

- Albandar JM, Rams TE. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontol 2000*. 2002;29:7–10.
- 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 May;57(5):539–49.
- Camilleri, M. Disorders of gastrointestinal motility. [ed.] Ausiello D, eds In: Goldman L Philadelphia: Saunders Elsevier 2007; chap 138.
- Chapple ILC, Van der Weijden F, Doerfer C, Herrera D, Shapira L, Polak D, et al. Primary prevention of periodontitis: managing gingivitis. *J Clin Periodontol*. 2015 Apr 1;42 Suppl 16:S71–6.
- De Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. Probiotics - compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(2, Suppl):421S-9S.).
- Dobson, A., Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C. 2012. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Applied and Environmental Microbiology* 78:1–6.
- Furuichi Y, Lindhe J, Ramberg P, Volpe AR. Patterns of de novo plaque formation in the human dentition. *J Clin Periodontol*. 1992 Jul;19(6):423–33.
- Grandy G, Medina M, Soria R, Terán CG, Araya M. Probiotics in the treatment of acute rotavirus diarrhoea. A randomized, double-blind, controlled trial using two different probiotic preparations in Bolivian children. *BMC Infect Dis* 2010; 10:253.
- Hallström H, Lindgren S, Yucel-Lindberg T, Dahlén G, Renvert S, Twetman S. Effect of probiotic lozenges on inflammatory reactions and oral biofilm during experimental gingivitis. *Acta Odontol Scand*. 2013 May;71(3-4):828–33.
- Horvath A, Dziechciarz P, Szajewska H. Meta-analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG for abdominal pain-related functional gastrointestinal disorders in childhood. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 33(12):1302-10.
- 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 Aug 1;39(8):736–44.
- Kimoto H, Ohmomo S, Okamoto T. Cholesterol removal from media by lactococci. *J Dairy Sci* 2002; 85(12):3182-8.
- Kinane DF, Attström R, European Workshop in Periodontology group B. Advances in the pathogenesis of periodontitis. Group B consensus report of the fifth European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2005;32 Suppl 6(s6):130–1.
- Kopp MV, Salfeld P. Probiotics and prevention of allergic disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009; 3:298-303

- 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.
- Lang NP. Commentary: bacteria play a critical role in the etiology of periodontal disease. *J Periodontol*. 2014 Feb;85(2):211–3.
- Lanza E, Magan-Fernandez A, Bermejo B, de Rojas J, Marfil-Alvarez R, Mesa F. Complementary clinical effects of red complex bacteria on generalized periodontitis in a caucasian population. *Oral Dis*. 2016 Jul;22(5):430–7.
- Lee J-K, Lee J-K, Kim S-J, Kim S-J, Ko S-H, Ko S-H, et al. Modulation of the host response by probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 in experimental gingivitis. *Oral Dis*. 2015 Sep;21(6):705–12.
- Löe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand*. 1963 Dec;21:533–51.
- Lye HS, Rusul G, Liong MT. Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. *J Dairy Sci* 2010; 93(4):1383-92
- 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 Jun 1;36(6):506–13.
- Moayyedi, P., Ford, A.C., Talley, N.J., Cremonini, F., Foxx-Orenstein, A.E., Brandt, L.J., Quigley, E.M. 2010. The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut* 59:325–332
- Ohland, C.L., MacNaughton, W.K. 2010. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 298:G807–G819.
- Park O-J, Yi H, Jeon JH, Kang S-S, Koo K-T, Kum K-Y, et al. Pyrosequencing Analysis of Subgingival Microbiota in Distinct Periodontal Conditions. *J Dent Res*. 2015 Jul;94(7):921–7.
- Ramasamy K, Abdullah N, Wong MC, Karuthan C, Ho YW. Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus* strains used as probiotics in chickens. *J Sci Food Agric* 2010; 90(1):65-9.
- Ready D, D'Aiuto F, Spratt DA, Suvan J, Tonetti MS, Wilson M. Disease severity associated with presence in subgingival plaque of *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Tannerella forsythia*, singly or in combination, as detected by nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. American Society for Microbiology; 2008 Oct;46(10):3380–3.
- Rousseaux, C., Thuru, X., Gelot, A., Barnich, N., Neut, C., Dubuquoy, L., Dubuquoy, C., Merour, E., Geboes, K., Chamailard, M., Ouwehand, A., Leyer, G., Carcano, D., Colombel, J.F., Ardid, D., Desreumaux P. 2007. *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nature Medicine* 13:35-37.

- Sánchez MC, Llama-Palacios A, Fernández E, Figuero E, Marín MJ, León R, Blanc V, Herrera D, Sanz M. An in vitro biofilm model associated to dental implants: structural and quantitative analysis of in vitro biofilm formation on different dental implant surfaces. *Dent Mater*. 2014 Oct;30(10):1161–71.
- 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 Oct 1;35(10):897–905.
- Silness J, Løe H. Periodontal disease in pregnancy. II. correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand*. 1964 Feb 1;22:121–35.
- Slawik S, Staufienbiel 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 Jul;65(7):857–63.
- Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*. 2005;38(1):135–87.
- 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 Oct;36(10):850–6.
- Tatakis DN, Trombelli L. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. I. Background review and rationale. *J Clin Periodontol*. 2004 Apr 1;31(4):229–38.
- Teughels W, Teughels W, Loozen G, Quirynen M. Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota? *J Clin Periodontol*. 2011 Mar;38 Suppl 11:159–77.
- Tomita S, Komiya-Ito A, Imamura K, Kita D, Ota K, Takayama S, et al. Prevalence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in Japanese patients with generalized chronic and aggressive periodontitis. *Microb Pathog*. 2013 Aug;61-62:11–5.
- Trombelli L, Tatakis DN, Scapoli C, Bottega S, Orlandini E, Tosi M. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. II. Identification of "high-responder" and "low-responder" subjects. *J Clin Periodontol*. 2004 Apr 1;31(4):239–52.
- Usman, Hosono A. Effect of administration of *Lactobacillus gasseri* on serum lipids and fecal steroids in hypercholesterolemic rats. *J Dairy Sci* 2000; 83(8):1705-11
- Van der Weijden GA, Hioe KPK. A systematic review of the effectiveness of self-performed mechanical plaque removal in adults with gingivitis using a manual toothbrush. *J Clin Periodontol*. 2005;32 Suppl 6(s6):214–28.
- Van der Weijden GA, Timmerman MF, Nijboer A, Reijerse E, Van der Velden U. Comparison of different approaches to assess bleeding on probing as indicators of gingivitis. *J Clin Periodontol*. 1994 Oct;21(9):589–94.
- Wara-aswapati N, Pitiphat W, Chanchaimongkon L, Taweechaisupapong S, Boch JA, Ishikawa I. Red bacterial complex is associated with the severity of chronic periodontitis in a Thai population. *Oral Dis*. Blackwell Publishing Ltd; 2009 Jul;15(5):354–9.

- Werner, T., Haller, D. 2007. Intestinal epithelial cell signalling and chronic inflammation: from the proteome to specific molecular mechanisms. *Mutation Research* 1:42–57.
- Wu CD, Savitt ED. Evaluation of the safety and efficacy of over-the-counter oral hygiene products for the reduction and control of plaque and gingivitis. *Periodontol* 2000. 2002;28:91–105.
- Young, R, Finocchiaro E, Sungsoo Cho JS. Prebiotics and Probiotics in Pediatric Diarrheal Disorders. En: *Handbook of Prebiotics and Probiotics Ingredients. Health benefits and Food Applications*. T New York: CRC Press, 2010.