

## PROTOCOLO INVESTIGACION

### **“Evaluación del metronidazol como antimicrobiano sistémico coadyuvante en el tratamiento quirúrgico de la periodontitis: un ensayo clínico aleatorizado”**

James R. Collins, Gabriel Ogando, Rolando Gonzáles, Elena Figuero, María José Marín,  
Mariano Sanz, David Herrera

#### **1. INTRODUCCIÓN**

La periodontitis crónica se define como una enfermedad inflamatoria que afecta a los tejidos de soporte del diente y que está causada por bacterias localizadas en el área subgingival. Las diferentes especies bacterianas adoptan una organización tridimensional definida conocida como biofilm. Esto confiere consecuencias clínicas desfavorables entre las que se encuentra la reducción de la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos.

La microbiota que forma parte del biofilm subgingival es compleja, sin embargo solamente un número reducido de bacterias se consideran relevantes en la progresión de la destrucción periodontal. Dentro de este grupo, *Porphyromonas gingivalis* es considerado un patógeno de fuerte asociación con la enfermedad periodontal en especial las periodontitis, también su presencia se asocia a la recurrencia de enfermedad o persistencia de bolsas profundas post-tratamiento.

Las enfermedades periodontales han demostrado que pueden tratarse con éxito mediante tratamiento mecánico, aunque la presencia y/o persistencia de un determinado patógeno periodontal puede alterar la respuesta clínica. Se ha demostrado que la eliminación de estos patógenos durante el tratamiento mejorará los resultados clínicos y minimiza el riesgo de futura pérdida de inserción. Aunque diversos estudios han demostrado que la eliminación total de estas especies periodontopatogénicas no es predecible con el tratamiento periodontal mecánico convencional.

El uso coadyuvante de antimicrobianos sistémicos al tratamiento mecánico de raspado y alisado radicular ha demostrado aportar beneficios relevantes en determinados pacientes y patologías, como en periodontitis crónicas, agresivas, formas avanzadas o en periodontitis asociada a determinados perfiles microbiológicos.

Sin embargo, en las situaciones clínicas que requieren cirugía periodontal la evidencia respecto al uso de antimicrobianos sistémicos es limitada. Haffajee et al. (2003) realizaron una revisión sistemática de la literatura sobre el posible efecto adicional del uso de antimicrobianos junto con cirugía periodontal a partir de tres estudios. Los resultados demostraron que se obtuvo un beneficio adicional en ganancia de inserción clínica de 0.609 mm (ganancia media ponderada,  $p=0.007$ ). Sin embargo, en este meta-análisis los autores analizaron de forma conjunta diferentes antibióticos (penicilina, tetraciclina y amoxicilina/clavulánico), diferentes formas de enfermedad (periodontitis agresiva -periodontitis juvenil/comienzo temprano-, localizaciones activas > 4 mm) y diferentes técnicas quirúrgicas (curetaje abierto, colgajo de Widman modificado). Una revisión sistemática posterior concluye que actualmente no existe suficiente evidencia respecto al uso de antimicrobianos sistémicos coadyuvantes a la cirugía periodontal con el objetivo de mejorar los resultados tanto clínicos como microbiológicos.

Los antimicrobianos que más atención han recibido en cirugía periodontal son las tetraciclinas, principalmente para periodontitis agresiva. Estudios iniciales obtuvieron resultados favorables, que fueron atribuidos a la supresión o reducción de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mediante tetraciclina o doxiciclina. Sin embargo, los resultados de estos estudios deben evaluarse con precaución, dado que los resultados no son consistentes en todos los estudios, el diseño empleado no es adecuado (series de casos), los tamaños muestrales empleados son reducidos a 4 - 8 pacientes o los diseños son a boca dividida. Dos ensayos clínicos posteriores evalúan el uso coadyuvante de tetraciclinas a cirugía periodontal. Haffajee et al. (1995) evaluaron el efecto de cuatro tratamientos sistémicos (tetraciclina, amoxicilina/clavulánico, ibuprofeno y placebo) en el tratamiento de periodontitis con localizaciones activas y progresión. En los resultados concluyen que el uso de antimicrobianos supone significativamente mayor ganancia de inserción y mejores resultados microbiológicos.

Palmer et al. (1996), por el contrario, no obtuvieron diferencias significativas frente a placebo, aunque el tratamiento fue secuencial y el número de pacientes fue reducido.

En pacientes *P. gingivalis*-positivos, la erradicación del patógeno mediante un antimicrobiano es un objetivo microbiológico del tratamiento periodontal, dada la capacidad del patógeno de invadir los tejidos. Entre los diferentes antimicrobianos disponibles, el metronidazol es considerado antibiótico de elección debido a su espectro antimicrobiano.

Sin embargo, la evidencia en relación al metronidazol como tratamiento coadyuvante a la cirugía periodontal es muy limitada. Dos ensayos clínicos analizan el efecto de metronidazol en pacientes con periodontitis crónica moderada-severa. Mahmood & Dolby (1987) no observaron mejoría clínica significativa en el grupo test, aunque sí un efecto positivo adicional en la respuesta clínica con metronidazol. En sujetos fumadores, con peor respuesta al tratamiento, el uso de metronidazol presentó un efecto adicional limitado. En ambos estudios, la técnica empleada fue el colgajo de Widman modificado.

Debido a la limitada evidencia disponible, son necesarios más estudios clínicos que evalúen el efecto del antimicrobiano metronidazol como tratamiento coadyuvante a la cirugía periodontal en pacientes con periodontitis crónica, especialmente en pacientes positivos para *P. gingivalis*.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. Hipótesis**

El uso de antimicrobianos sistémicos como tratamiento coadyuvante a la cirugía periodontal, aporta un beneficio adicional en los resultados clínicos y microbiológicos en el tratamiento de pacientes con periodontitis crónica moderada-severa generalizada.

### **2. 2. Objetivos**

Objetivo principal

Determinar si el uso de antimicrobianos sistémicos (metronidazol) frente a placebo como tratamiento coadyuvante a la cirugía periodontal aporta beneficios adicionales clínicos (reducción de profundidad de sondaje en localizaciones que reciben tratamiento periodontal quirúrgico) y microbiológicos en pacientes con periodontitis crónica generalizada severa.

Objetivos secundarios

Determinar si existen diferencias en cuanto a variables clínicas (profundidad de sondaje, recesión, nivel de inserción y grado de afectación furcal), microbiológicas (frecuencia de detección y recuentos de los diferentes patógenos evaluados) y centradas en el paciente (aparición de efectos secundarios, descripción del efecto adverso y grado de afectación del efecto adverso).

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

Se diseña un ensayo clínico aleatorizado, paralelo, controlado por placebo y triple ciego (pacientes, examinadores/operadores y responsable del análisis de datos). El seguimiento del estudio es de 1 año.

#### **3.1. Aspectos éticos**

La presente investigación se basa en el cumplimiento de los principios de la declaración de Helsinki. El comité ético de la Pontificia Universidad Madre y Maestra (PUCMM) será el encargado de la evaluación y aprobación del presente protocolo. Todos los pacientes serán exhaustivamente informados previo a la inclusión en el estudio a través del consentimiento informado.

#### **3.2. Participantes**

Población de referencia

Pacientes procedentes del departamento de Periodoncia de la Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra recinto Santo Tomás de Aquino. El presente estudio incluirá sujetos tras ser evaluados en la visita de reclutamiento en relación con los siguientes criterios:

Criterios de inclusión

- (i) Diagnóstico de periodontitis crónica generalizada moderada-severa (Armitage 1999).
- (ii) Tener al menos 10 dientes en función, excluyendo terceros molares.
- (iii) Presentar localizaciones con profundidad de sondaje (PS)  $\geq 6$  mm en  $\geq 2$  dientes en  $\geq 1$  cuadrante
- (iv) Presentar evidencia radiográfica de pérdida ósea  $\geq 30\%$  en, al menos, el 30% de la dentición.
- (v) Pacientes mayores de 18 años.

## Criterios de exclusión

- (i) Mujeres embarazadas o en período de lactancia.
- (ii) Presentar patología sistémica y/o con toma de medicación que pueda afectar a la situación periodontal y/o pacientes que requieran profilaxis antibiótica.
- (iii) Haber recibido tratamiento antimicrobiano sistémico en los 3 meses previos.
- (iv) Haber recibido tratamiento periodontal en los 6 meses previos al comienzo del estudio.
- (v) Pacientes alérgicos a metronidazol, o a alguno de los componentes de las formulaciones comerciales de los mismos (Flagyl®).
- (vi) Pacientes que rechacen firmar el consentimiento informado.
- (vii) Fumador de 10 o más cigarrillos al día.

## Centro de trabajo

Los pacientes potenciales para incluir en el estudio serán reclutados y tratados en el máster de Periodoncia de la PUCMM.

## Población de estudio

Los pacientes candidatos a participar en el estudio serán informados verbalmente y por escrito de los objetivos y protocolo del estudio. Se entregará el consentimiento informado y los pacientes que voluntariamente acepten participar conformarán la población de estudio del presente ensayo clínico.

### **3.3. Diseño del estudio (Intervenciones)**

Las intervenciones y procedimientos a seguir en la realización del estudio quedan detallados a continuación:

#### Calibración previa

Un examinador experimentado (J.C.) realizará un ejercicio de calibración previo al comienzo del estudio con 4 pacientes que presenten periodontitis crónica generalizada severa. El examinador designado realizará las mediciones a boca completa de PS y recesión del margen gingival (REC) sobre los 4 pacientes reclutados. Transcurridas 12 horas, el examinador repetirá las mediciones sobre los mismos pacientes. Se evaluará la concordancia intra-examinador, la cual deberá ser de al menos, el 98% en la concordancia de mediciones con un valor de tolerancia de  $\pm 2$  mm.

#### Fase 0. Reclutamiento de pacientes.

A partir de la fecha de comienzo del estudio, todos los pacientes que acudan al centro de trabajo designado serán potencialmente considerados para ser incluidos en el estudio. Tras una evaluación clínica y radiográfica inicial, aquellos pacientes susceptibles de participar en el estudio, los pacientes rellenarán el formulario de historia médica mediante cuestionario, el cual será revisado verbalmente por el clínico. En ese momento se dará información y se obtendrá el consentimiento, y se da una cita para la evaluación inicial. Todos los sujetos que cumplan con los criterios preestablecidos serán invitados a participar en el estudio hasta alcanzar el tamaño muestral deseado en los grupos de tratamiento quirúrgico.

En la evaluación inicial, se realizará una exploración clínica para establecer el diagnóstico periodontal, incluyendo la evaluación a boca completa de PS y REC en seis localizaciones/diente, excluidos los terceros molares. Se realizará un serie radiográfica periapical completa (técnica de paralelización). Se les tomará una muestra para análisis microbiológico.

#### Fase I de tratamiento (Fase no quirúrgica).

Todos los sujetos comenzarán con sesiones de motivación e instrucciones de higiene oral, con el objetivo de asegurar que los sujetos puedan mantener un control de placa

adecuado a lo largo de la evolución del estudio (índice de placa -IP- pre-tratamiento < 20%).

El raspado y alisado radicular será ejecutado por alumnos de segundo año del programa de máster en Periodoncia mediante instrumentación radicular mecánica y manual, un operador experimentado supervisará y terminará la instrumentación radicular. En cada sesión se instrumentarán 2 cuadrantes en una cita de 2 horas de duración. Los cuatro cuadrantes serán realizados en el transcurso de una semana a dos semanas. Se empleará anestesia local. A partir de la primera cita de tratamiento, los pacientes emplearán enjuagues de clorhexidina al 0.12% dos veces al día, durante 2 semanas. En cada cita se reforzarán las instrucciones de higiene oral.

En la visita de reevaluación post-raspado y tras el registro de placa dental bacteriana, se realizará una profilaxis supra gingival para eliminar las posibles tinciones ocasionadas por el uso de colutorios de clorhexidina, coadyuvantes al tratamiento no quirúrgico.

Durante la fase no quirúrgica no será administrado tratamiento antimicrobiano sistémico, evitando así inferencias en los resultados como consecuencia del tratamiento secuencial (Herrera et al. 2008).

Fase II de tratamiento (Fase quirúrgica).

La re-evaluación de la fase no quirúrgica tendrá lugar a las 6 semanas de la última sesión de raspado y alisado radicular. En ese momento se realizará una nueva exploración periodontal completa. En la fase quirúrgica se incluirán a todos los pacientes con PS > 5 mm en más de dos dientes por sextante (Waerhaug 1978, Caffesse et al. 1986) o aquellos que presenten múltiples localizaciones con PS  $\geq$  5 mm con sangrado al sondaje en  $\geq$  1 cuadrante (Matuliene et al. 2008) y siempre que se estime de forma subjetiva la necesidad de cirugía periodontal evaluado por 1 periodoncista con experiencia. Tras las cirugías se pautarán sprays de clorhexidina (0.12% CHX, cada 12 h/ 2 semanas) (PyoClor<sup>®</sup> - Laboratorios Unión, Santo Domingo, República Dominicana). Con la última

sesión de cirugía, se prescribirá el antibiótico/placebo asignado. Todo el tratamiento quirúrgico se llevará a cabo en el plazo máximo de 2 semanas.

La técnica quirúrgica para el tratamiento de la periodontitis crónica generalizada severa será el de Kirkland 1931, con osteoplastia del tejido óseo en los casos que sea necesario. Las incisiones serán intrasurculares, tratando de no llegar a los dientes adyacentes no comprometidos. La técnica de sutura de elección será la sutura continua dentoanclada. Las lesiones de furcas serán tratadas mediante plastia de la furca (odontoplastia y osteoplastia) y tunelización (Hamp 1975). Si fuese necesario hacer técnicas de cirugía regenerativa solo se empleará como material de regeneración injerto alogénico (Mineross® Biohorizons) y en ningún caso se prescribirán antimicrobianos postquirúrgicos (Rollke, Schacher et al. 2012). Los dientes que requieran técnicas de regeneración periodontal/cirugía mucogingival quedan excluidos del análisis. Si fuese necesario realizar cirugía en los sextantes anteriores la técnica quirúrgica será en lo posible de carácter conservador para evitar compromiso estético, evitando la realización de rodetes (colgajos de preservación de papila (Cortellini 1995, Cortellini 1999), suturados mediante puntos colchonero horizontal interno modificado por Laurell. Todos los tratamientos quirúrgicos serán realizados por alumnos de segundo curso del máster de periodoncia de la PUCMM.

A la semana de cada cirugía se procederá a la retirada de las suturas. Tras la realización de la última cirugía, el paciente será asignado a su grupo de tratamiento antimicrobiano correspondiente, recibiendo la medicación y las instrucciones para su toma. Además, se hará un desbridamiento superficial mediante ultrasonidos en el resto de la boca, no sometida a cirugía ese día. La cita de retirada de sutura se planificará a los 8-10 días y los pacientes deberán devolver los blisters y se registrará el número de comprimidos no tomados así como los posibles efectos adversos debidos a la medicación. Un individuo independiente será el encargado de registrar las variables relacionadas con la toma de la medicación.

Fase III de tratamiento (Fase de mantenimiento).

La re-evaluación de la fase quirúrgica tendrá lugar a los 3 meses de la última sesión de cirugía. A partir de este momento se pautarán mantenimientos cada 3 meses hasta completar el año de duración del estudio. Durante las citas de mantenimiento se procederá a reforzar los hábitos de higiene oral si fuese necesario, y se realizará profilaxis y pulido supragingival de todas las superficies dentarias presentes (Fig. 1).

Protocolo de seguridad

El empeoramiento de los parámetros clínicos durante la fase de mantenimiento supondrá la exclusión del paciente del estudio para su re-tratamiento. Se considerarán inestables aquellas localizaciones que post-tratamiento tengan pérdidas de inserción > 2 mm entre 2 visitas consecutivas (Haffajee et al. 1983). Dichos pacientes recibirán tratamiento adicional y serán excluidos del estudio.

### **3.4. Recogida de datos**

Los parámetros clínicos serán registrados al inicio del estudio, 6 semanas tras completar la fase I (post-raspado), 3 meses post-cirugía, 6 meses y al año. Las muestras microbiológicas serán obtenidas al inicio del estudio y a los 12 meses. Las variables centradas en el paciente se registrarán en la visita de retirada de sutura tras la última cirugía.

#### **3.4.1. Parámetros clínicos**

Los parámetros clínicos serán registrados con sonda manual UNC-15 mm (Hu-Friedy, Leinmen, Alemania) en todos los dientes presentes, en seis localizaciones por diente. Un examinador será responsable de los registros clínicos.

- Profundidad de sondaje (PS).

- Recesión gingival (REC).
- Sangrado al sondaje (BoP).
- Nivel de inserción clínico (calculado como la suma de PS y REC)

#### 3.4.2. Toma de muestras

En cada cuadrante, se seleccionará la localización más accesible con la bolsa más profunda y sangrado. Estas localizaciones serán las mismas a lo largo de todo el estudio, con la previsión de que, al tener las bolsas más profundas, sean probables candidatas a necesitar tratamiento quirúrgico. Se registrarán específicamente las variables clínicas en estas localizaciones (IP, SAS, PS y REC). Las muestras las recolectará un solo examinador y se tomarán con dos puntas de papel consecutivas de tamaño mediano (Maillefer, Ballaigues, Suiza) en cada localización. La placa subgingival se recogerá tras eliminar todos la placa y restos supragingivales (Wikstrom y cols. 1991). Antes de la toma de muestra, se aislarán las localizaciones para evitar la saliva mediante rollos de algodón y secando con la jeringa de agua-aire suavemente, para evitar contaminaciones. Las puntas de papel se mantendrán en su posición durante 10 segundos y se transferirán a un vial estéril eppendorf vacío. El vial se congelará inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y será enviado para su procesado en un plazo máximo de 6 meses.

#### 3.4.3. Análisis microbiológico

Procedimiento de extracción de ADN y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa multiplex (q-PCR).

Las muestras se volvieron a suspender en 1 ml de agua (Water PCR grade Roche Diagnostic GmbH; Mannheim, Germany) y se agitaron durante 2 minutos en el ajuste máximo. Luego, se retiraron las puntas de papel, los viales se centrifugaron a 13.000 rpm durante 3 min y se descartó el sobrenadante. Los gránulos resultantes se procesaron con un kit comercial para la extracción de ADN (MoIYsis Complete5. Molzym GmbH & Co.KG. Bremen, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. La elución

final del ADN se realizó en 100 µL de agua (Water PCR grade, Roche Diagnostic GmbH; Mannheim, Germany). El ADN disuelto en agua estéril se almacenó congelado (-20 °C) hasta su análisis por qPCR.

Las muestras de ADN subgingival se procesaron mediante PCR cuantitativa multiplex (qPCR) para detectar y cuantificar el ADN bacteriano de *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia* (Marin et al., 2019). Las amplificaciones de qPCR se realizaron con sondas Taqman utilizando cebadores específicos para estos patógenos periodontales putativos dirigidos al gen 16S rRNA (Boutaga, van Winkelhoff, Vandenbroucke-Grauls y Savelkoul, 2003, 2005). Se realizaron en un volumen de mezcla de reacción total de 10 µL, que incluía 5 µL de mezcla maestra 2×TaqMan (LC 480 Probes Master, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Alemania), concentraciones óptimas de cebadores y sonda de hidrólisis (300, 300 y 200 nM para *A. actinomycetemcomitans*, 300, 300 y 300 nM para *P. gingivalis* y 300, 300 y 200 nM para *T. forsythia*) y 2,5 µL de ADN de las muestras. El control sin plantilla (NTC) consistió en 2,5 µL de agua estéril. Las muestras se sometieron a un ciclo de amplificación inicial de 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min en termociclador LightCycler® 480 II (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Alemania). Cada muestra de ADN se analizó por duplicado.

Todos los ensayos se realizaron utilizando curvas de calibración con una detección cuantitativa lineal rango establecido por el rango de pendiente de 3,3–3,6 ciclos/década logarítmica,  $r_2 > 0,997$  y un rango de eficiencia de 1,9–2,0. La curva estándar para cada bacteria se desarrolló aislando el ADN de la bacteria que contenía 108 unidades formadoras de colonias (UFC) ml<sup>-1</sup> y luego realizando diluciones en serie de 10 veces para cada ADN en agua esterilizada. Después de ejecutar qPCR, se obtuvo un valor de ciclo de punto de cruce (Cp) para cada dilución bacteriana, lo que permitió determinar la concentración bacteriana.

#### 3.4.4. Cuestionarios

En la visita de retirada de suturas a los 8-10 días de la última cirugía, se realizará un cuestionario para evaluar las percepciones de los pacientes sobre el tratamiento antimicrobiano:

- Aparición de efectos secundarios (Sí/No).
- Descripción del efecto adverso acontecido.
- Grado de afectación (leve/moderado/severo).

De manera adicional, se evaluará el cumplimiento, tanto mediante diario de toma como por evaluación de los blisters.

#### 3.5. Aleatorización

Los sujetos serán aleatoriamente asignados a los grupos de tratamiento en orden ascendente según un sistema de distribución equilibrada a través de una tabla generada por ordenador de números aleatorios (random block design).

#### 3.6. Ocultación de la asignación (enmascaramiento)

El método de ocultación de asignación seleccionado será a través de sobres opacos que no permitan ver el contenido al trasluz, sellado y secuencialmente numerado (Schulz et al. 1995). La medicación se preparará para 50 pacientes (25 pacientes test metronidazol y 25 placebo). De cara al enmascaramiento se prepararán blisters indistinguibles para ambos grupos.

#### 3.7. Implementación

El coordinador de la investigación, quien no participa en el tratamiento de los pacientes, será el encargado de la aleatorización y asignación de los pacientes.

Los 50 sobres opacos (25/grupo) serán enviados al coordinador del proyecto, quien será la única persona con acceso a ellos. El coordinador codificará numéricamente los sobres del 1-50 en función de la aleatorización. Hasta que no se dé por finalizado el análisis de los datos, examinadores, pacientes y estadístico desconocerán el contenido de los sobres.

### **3.8. Cegamiento**

Se trata de un estudio triple ciego, en el cual el examinador, los participantes, y la persona responsable del manejo de los datos estadísticos desconocen la asignación de los grupos.

### **3.9. Cálculo del tamaño muestral**

Para el cálculo del tamaño muestral se empleó la información obtenida en estudios previos sobre el uso coadyuvante de antibióticos en el tratamiento de la periodontitis en relación con la variable respuesta primaria (cambio en la profundidad de sondaje) (Guerrero y cols. 2005). De esta forma el cálculo del tamaño muestral se realizará para la variable principal, cambios en PS (entre basal y 1 año, o pre-qx a 1año post-qx), considerando una desviación estándar de 0.8 mm, una diferencia deseable entre grupos de 1.0 mm, una razón de muestreo 1:1, con un 90% de potencia y un error alfa del 5%, lo que resulta en 14 pacientes por brazo. Con la intención de compensar las potenciales pérdidas de pacientes a lo largo del seguimiento, se seleccionó una muestra final de 50 pacientes con periodontitis crónica (25 pacientes por grupo).

### **3.10. Análisis estadístico**

#### **3.10.1. Variables respuesta**

Las variables se calculan por paciente y visita y después por grupo.

a) Variable respuesta primaria

El cambio en el promedio PS, entre la visita inicial y la final (1 año), en las localizaciones test (localizaciones que reciban tratamiento quirúrgico).

b) Variables secundarias

- Cambios en el promedio PS, entre la visita post-raspado y la final (1 año)
- Cambios en la PS al inicio y visitas de instrumentación post-subgingival
- Resultados clínicos periodontales en el posquirúrgico visitas de seguimiento
- Resultados clínicos periodontales: lineales generales modelos para PD y CAL
- Cambios en IP de boca completa.
- Cambios en el sangrado al sondaje (SAS).
- Recuento y frecuencias de detección para cada patógeno periodontal detectado (*A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia*).
- Porcentaje de aparición de efectos secundarios y graduación de los mismos.

3.10.2. Comparaciones intra e intergrupo

Se realizará un análisis de los sujetos perdidos a lo largo del estudio y el análisis de los datos se realizará mediante intención de tratar (ITT).

Se evaluará la normalidad de la distribución, mediante una representación gráfica de los datos en forma de diagramas de cajas y mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. En función de la distribución de los datos se emplearán test paramétricos o no paramétricos.

a) Variables clínicas.

Para las comparaciones intragrupo, se utilizarán técnicas de análisis de la variancia (ANOVA) con correcciones de Bonferroni para comparar la visita inicial con la visita a 3, 6 y 12 meses en cada grupo.

Para las comparaciones intergrupo, se empleará ANCOVA para comparar los grupos, tanto en la visita inicial como para evaluar cambios entre la visita inicial y las visitas de seguimiento.

#### b) Variables microbiológicas.

Se utilizarán dos variables microbiológicas: frecuencia de detección de los patógenos diana y recuentos de cada patógeno

La frecuencia de detección se comparará usando el test de chi-cuadrado para las evaluaciones inter-grupo en la visita inicial y en cada visita de seguimiento, o mediante el test de McNemar para evaluaciones intra-grupo, para cambios entre la visita inicial y las visitas de seguimiento.

La transformación logarítmica del recuento de patógenos se compararán usando el test de los rangos con signos (intra-grupo) o mediante el test de Wilcoxon de suma de rangos para las comparaciones inter-grupo.

El nivel de significación clínica se establece en  $p < 0.05$ . Debido a que se emplearán comparaciones múltiples para los resultados inter-grupo, se utilizará la corrección de Bonferroni.

Las variables demográficas en la visita inicial se compararán mediante el test-t (edad) o del test de Fisher (fumadores y sexo).

#### 3.10.3. Análisis de regresión

Se realizará un análisis multivariante mediante la creación de un modelo de regresión lineal múltiple, considerando como variable dependiente el cambio en la PS y como variable independiente el grupo de estudio al que pertenezcan los pacientes (placebo o metronidazol). Se analizará el papel de las variables respuesta secundarias registradas, así como el papel de la edad y el tabaco, como potenciales variables de confusión o variables modificadoras del efecto (interacción). Aquellas que demuestren un efecto,

serán incluidas en el modelo de regresión de forma que el efecto del grupo en la variable respuesta primaria cambio en la profundidad de sondaje será ajustado por el efecto de dichas variables. Se estudiará la influencia de la presencia de *P. gingivalis* en los resultados clínicos.

Todos los análisis estadísticos serán realizados mediante el software estadístico SPSS v 19.0.

### 3.11. Aspectos de diseño, seguridad y confidencialidad

Seguridad: Metronidazol es generalmente bien tolerado, como se observa en la información adjunta. El raspado y alisado radicular puede provocar, al igual que la cirugía periodontal, inflamación, sangrado, infección postoperatoria, hipersensibilidad dentinaria.

Eventos adversos: Un evento adverso (EA) se define como un evento médico no deseado en un paciente o sujeto de una investigación clínica al que se le ha administrado un producto farmacéutico, aunque no necesariamente tiene una relación causal con ese producto. Todos los EA deben ser documentados y seguidos hasta que se resuelvan. Un EA serio es la ocurrencia un efecto médico no deseado, ante la toma del producto a cualquier dosis:

- Que resulta en muerte.
- Que supone riesgo de muerte.
- Requiere hospitalización o prolongar una hospitalización previa.
- Resulta en una incapacidad significativa y/o persistente.
- Es un defecto de nacimiento o anomalía congénita.

Cualquier EA serio inesperado y relacionado con la droga debe de ser reportado con rapidez. El comité ético y las agencias reguladoras deben de ser informados en los siguientes 7 días al conocimiento del EA serio con resultado fatal o con riesgo para la vida, y se debe de mandar un informe completo en los 8 días siguientes.

Ante otros AE serios sin resultado fatal o sin riesgo para la vida, se debe informar a las autoridades en los siguientes 15 días al conocimiento por parte del investigador principal, y se decidirá en esos días si hace falta remitir un informe completo. Si hay infección, se hará antibiograma.

Los pacientes serán informados de los signos y síntomas para vigilar posibles alergias al tomar las medicaciones. Los pacientes, cada vez que sean revisados, serán preguntados por posibles AE además de la evaluación del examinador.

Confidencialidad de los datos y registros de los pacientes. Ninguna persona, a parte de los investigadores, y los datos recogidos de los sujetos solo se utilizarán con su consentimiento. Los datos serán introducidos en programas de bases de datos, y conservados en ordenadores con acceso restringido por contraseña. A cada paciente se le asignará un código de estudio y las claves serán mantenidas separados de los datos y en posesión del investigador principal. Los documentos con los registros de cada paciente solo serán identificados con los códigos, sin ningún otro sistema que permita identificar al sujeto. Las copias en papel se conservarán en un armario con cierre con llave: estos registros, incluida toda la documentación del comité ético y otros documentos reguladores, estarán custodiados por el investigador principal. Estos registros serán accesibles a la inspección y copia por las autoridades autorizadas. Las hojas de reclamación y las quejas se enviarán al investigador principal.

## Referencias

1. Armitage, G. C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 4, 1-6.
2. Marsh, P. D. (2005). Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol* 32 Suppl 6, 7-15.
3. Moore, L. V. & Moore, W. E. (1994). *Oribaculum catoniae* gen. Nov., sp. Nov.; *Catonella morbi* gen. Nov., sp. Nov.; *Hallella seregens* gen. Nov., sp. Nov.; *Johnsonella ignava* gen. Nov., sp. Nov.; and *Dialister pneumosintes* gen. Nov., comb. Nov., nom. Rev., Anaerobic gram-negative bacilli from the human gingival crevice. *Int J Syst Bacteriol* 44, 187-192.
4. AAP. Consensus Report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol* 1996; 1: 926-32.
5. Herrera, D., Contreras, A., Gamonal, J., Oteo, A., Jaramillo, A., Silva, N., Sanz, M., Botero, J. E. & Leon, R. (2008b). Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J Clin Periodontol* 35, 106-113.
6. van Winkelhoff, A. J., van der Velden, U. & de Graaff, J. (1988). Microbial succession in recolonizing deep periodontal pockets after a single course of supra- and subgingival debridement. *J Clin Periodontol* 15, 116-122.
7. Winkel, E. G., van Winkelhoff, A. J. & van der Velden, U. (1998). Additional clinical and microbiological effects of amoxicillin and metronidazole after initial periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 25, 857-864.
8. Mombelli, A., Schmid, B., Rutar, A. & Lang, N. P. (2000). Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomyetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. *J Periodontol* 71, 14-21.
9. Lindhe, J. & Nyman, S. (1975). The effect of plaque control and surgical pocket elimination on the establishment and maintenance of periodontal health. A longitudinal study of periodontal therapy in cases of advanced disease. *J Clin Periodontol* 2, 67-79.

10. Winkel, E. G., Van Winkelhoff, A. J., Timmerman, M. F., Vangsted, T. & Van der Velden, U. (1997). Effects of metronidazole in patients with "refractory" periodontitis associated with *Bacteroides forsythus*. *J Clin Periodontol* 24, 573-579.
11. Renvert, S., Wikstrom, M., Dahlen, G., Slots, J. & Egelberg, J. (1990a). Effect of root debridement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 17, 345-350.
12. Renvert, S., Wikstrom, M., Dahlen, G., Slots, J. & Egelberg, J. (1990b). On the inability of root debridement and periodontal surgery to eliminate *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 17, 351-355.
13. van Winkelhoff, A. J., Rams, T. E. & Slots, J. (1996) Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol 2000* 10, 45-78.
14. Herrera, D., Sanz, M., Jepsen, S., Needleman, I. & Roldan, S. (2002). A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 29 Suppl 3, 136-159.
15. Haffajee, A. D., Socransky, S. S. & Gunsolley, J. C. (2003). Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Ann Periodontol* 8, 115-181.
16. Lindhe, J. and Palmer, R. (2002), Group C summary. *Journal of Clinical Periodontology*, 29: 160–162.
17. Kunihiro, D. M., Caine, F. A., Palcanis, K. G., Best, A. M. & Ranney, R. R. (1985). A clinical trial of phenoxymethyl penicillin for adjunctive treatment of juvenile periodontitis. *J Periodontol* 56, 352-358.
18. Haffajee, A. D., Dibart, S., Kent, R. L., Jr. & Socransky, S. S. (1995). Clinical and microbiological changes associated with the use of 4 adjunctive systemically administered agents in the treatment of periodontal infections. *J Clin Periodontol* 22, 618-627.

19. Palmer, R. M., Watts, T. L. & Wilson, R. F. (1996). A double-blind trial of tetracycline in the management of early onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 23, 670-674.
20. Herrera, D., Alonso, B., Leon, R., Roldan, S. & Sanz, M. (2008a) Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *J Clin Periodontol* 35, 45-66.
21. Lindhe, J. & Liljenberg, B. (1984) Treatment of localized juvenile periodontitis. Results after 5 years. *J Clin Periodontol* 11, 399-410.
22. Kornman, K. S. & Robertson, P. B. (1985) Clinical and microbiological evaluation of therapy for juvenile periodontitis. *J Periodontol* 56, 443-446.
23. Mandell, R. L., Tripodi, L. S., Savitt, E., Goodson, J. M. & Socransky, S. S. (1986). The effect of treatment on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 57, 94-99.
24. Jaffin, R. A., Greenstein, G. & Berman, C. L. (1984) Treatment of juvenile periodontitis patients by control of infection and inflammation. Four case reports. *J Periodontol* 55, 261-267.
25. Mahmood, M. M. & Dolby, A. E. (1987). The value of systemically administered metronidazole in the modified Widman flap procedure. *J Periodontol* 58, 147-152.
26. Soder, B., Nedlich, U. & Jin, L. J. (1999). Longitudinal effect of non-surgical treatment and systemic metronidazole for 1 week in smokers and non-smokers with refractory periodontitis: a 5-year study. *J Periodontol* 70, 761-771.
27. Boutaga, K., van Winkelhoff, A. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Savelkoul, P. H. (2003). Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), 4950-4954. doi:10.1128/jcm.41.11.4950-4954.2003
28. Boutaga, K., van Winkelhoff, A. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Savelkoul, P. H. (2005). Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 45(2), 191-199. doi:10.1016/j.femsim.2005.03.011

29. Marin, M. J., Ambrosio, N., O'Connor, A., Herrera, D., Sanz, M., & Figuero, E. (2019). Validation of a multiplex qPCR assay for detection and quantification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque samples. A comparison with anaerobic culture. *Archives of Oral Biology*, *102*, 199-204.  
doi:10.1016/j.archoralbio.2019.04.014