



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE RESTAURADORA  
ÁREA DE CARIOLOGÍA**

**EFFECTO DEL USO TÓPICO/SISTÉMICO DEL PROBIÓTICO *Lactobacillus rhamnosus* EN LA DENSIDAD MINERAL, MICRODUREZA SUPERFICIAL Y MORFOLOGÍA SUPERFICIAL DE ESMALTE EN UN MODELO DE CARIES *in situ***

**Johanny Giovanni Seguel Valenzuela**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Dr. Rodrigo Cabello Ibacache**

**Adscrito a Proyecto FIOUCH 17/015.  
Santiago - Chile  
2020.**





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE RESTAURADORA  
ÁREA DE CARIOLOGÍA**

**EFFECTO DEL USO TÓPICO/SISTÉMICO DEL PROBIÓTICO *Lactobacillus rhamnosus* EN LA DENSIDAD MINERAL, MICRODUREZA SUPERFICIAL Y MORFOLOGÍA SUPERFICIAL DE ESMALTE EN UN MODELO DE CARIES *in situ***

**Johanny Giovanni Seguel Valenzuela**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Dr. Rodrigo Cabello Ibacache**

**Adscrito a Proyecto FIOUCH 17/015.  
Santiago - Chile  
2020.**

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, que, con su amor incondicional, apoyo diario y contención emocional, todo esto fue posible. Gracias por confiar y creer en mí, por estar pendientes y preocupados tanto en mi vida universitaria, como en mi crecimiento personal, todo lo que soy, es gracias a ustedes, los amo.

A mis profesores tutores, Dr. Gonzalo Rodríguez y Dr. Rodrigo Cabello, quienes me ayudaron y me guiaron en esta última etapa. Gracias por todo el tiempo invertido en este trabajo, como también en mi crecimiento como profesional.

A mis amigos, por ser mi sostén en mis momentos de estrés y de frustración. Fueron un pilar fundamental en mi vida universitaria, gracias por tantas alegrías durante estos 7 años.

A las personas que, por distintos motivos ya no están a mi lado, pero que, sin duda, fueron muy importantes en este largo camino.

A todos ustedes, infinitas gracias...

## ÍNDICE

<b>I. RESUMEN</b>	
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	
2.1 Introducción	9
2.2 Caries y biopelícula	10
2.3 Esmalte dental	11
2.4 Desmineralización – Remineralización	12
2.5 Probióticos	14
2.6 Modelos <i>in situ</i>	15
2.7 Planteamiento del problema	16
<b>III. HIPÓTESIS</b>	18
<b>IV. OBJETIVO GENERAL</b>	18
<b>V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	18
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	19
6.1 Aspectos éticos	19
6.2 Diseño Experimental	19
6.3 Construcción de la muestra	20
6.4 Obtención y almacenamiento de los dientes	21
6.5 Preparación de los bloques de esmalte	21
6.6 Obtención y diseño del dispositivo intraoral	22
6.7 Fase clínica de los grupos experimentales	23
6.8 Recolección de dispositivos	24
6.9 Microdureza superficial de Vickers (MSV)	24
6.10 Microtomografía computarizada (Micro- CT) y densidad mineral	25
6.11 Microscopía electrónica de barrido (MEB)	26
6.12 Análisis estadístico	26

<b>VII. RESULTADOS</b>	28
7.1 Microdureza Superficial	28
7.2 Espesor del esmalte (micro-CT) y Densidad Mineral	30
7.3 Microscopia electrónica de barrido (MEB): Morfología superficial	33
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	35
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	41
<b>X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	42
<b>XI. ANEXO 1: Acta de aprobación proyecto de investigación</b>	50
<b>XII. ANEXO 2: Consentimiento informado</b>	53
<b>XIII. ANEXO 3: Ficha Clínica</b>	55
<b>XIV. ANEXO 4: Donación de terceros molares</b>	57
<b>XV. ANEXO 5: Protocolo de intervención probiótico tópico/sistémico</b>	59
<b>XVI. ANEXO 6: Evaluación de cumplimiento</b>	62
<b>XVII. ANEXO 7: Evaluación de cumplimiento final</b>	63

## I. RESUMEN

**Introducción:** La caries dental es una enfermedad muy prevalente a nivel mundial, la cual no solo afecta los tejidos dentarios, sino que también afecta la calidad de vida de las personas, es por esto que a lo largo de los años se han tratado de confeccionar diferentes estrategias para prevenirla. Actualmente se están estudiando diferentes microorganismos vivos, llamados probióticos, los cuales, son definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como microorganismos vivos que cuando se administran en dosis adecuadas confieren un beneficio para la salud del hospedero, y estos han demostrado que pueden tener un papel fundamental en la cavidad oral y en la prevención de la enfermedad de caries.

**Objetivo:** Establecer las diferencias en la dureza superficial, densidad mineral y morfología superficial de bloques de esmalte de un modelo *in situ* de caries luego de la administración de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formato tópico/sistémico comparado con bloques de esmalte expuestos exclusivamente a sacarosa.

**Metodología:** Mediante un modelo de caries *in situ*, 14 voluntarios utilizaron un dispositivo intraoral que contenía 5 bloques de esmalte por 14 días durante día y noche. Al bloque de esmalte ubicado en palatino se le cubrió la mitad con esmalte de uñas para aislarlo del medio oral, este fue el grupo control negativo. Los voluntarios fueron asignados aleatoriamente a dos grupos: grupo experimental expuesto al probiótico *Lactobacillus rhamnosus* de manera tópico/sistémico y sacarosa (grupo mixto) y grupo control positivo expuesto solamente a sacarosa. Ambos grupos cumplieron el desafío cariogénico de instilar cada 2 horas 8 veces al día sacarosa sobre los bloques. A su vez, el grupo mixto consumió una vez al día 150 mL de agua en la que se suspendió una dosis liofilizada de *Lactobacillus rhamnosus* con el aparato en boca. En las muestras de esmalte se evaluó microdureza superficial, densidad mineral y morfología superficial.

**Resultados:** La densidad mineral y la microdureza superficial presentaron una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control negativo, grupo experimental expuesto a probiótico/sacarosa y grupo control positivo ( $P < 0.05$ ). Cabe destacar que tanto el grupo experimental, como el grupo control positivo presentaron valores inferiores al grupo control negativo. Por otro lado la morfología superficial de las muestras pertenecientes al grupo expuesto solamente a sacarosa se observaron más irregulares y porosas que el grupo expuesto al probiótico/sacarosa.

**Conclusiones:** La exposición al probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formato tópico/sistémico demostró un efecto benéfico/protector frente a los fenómenos de desmineralización en bloques de esmalte en un modelo de caries *in situ*, comprobado mediante la dureza superficial, densidad mineral y morfología superficial de estos.



## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Introducción

Las enfermedades dentales son muy frecuentes en todo el mundo (Matsuyama y cols., 2019). Tal cual se reporta en la literatura, éstas son altamente prevalentes, afectando aproximadamente 3,9 mil millones de personas en todo el mundo (Listl y cols., 2015). Dentro de éstas, se encuentra la caries dental, la cual es definida como una enfermedad crónica, multifactorial y no transmisible, que se caracteriza por la desmineralización de la superficie dentaria por la acción de los ácidos producidos por el metabolismo bacteriano de los carbohidratos simples de la dieta (Selwitz y cols., 2007). Esta enfermedad no solo afecta los tejidos dentarios, sino que también afecta la calidad de vida de las personas que la padecen, debido principalmente al dolor, junto con la imposibilidad de realizar acciones como masticar, lo que puede producir una pérdida del apetito, baja de peso, dificultad para dormir, problemas psicológicos y emocionales (Freitte y cols., 2013).

A nivel nacional la prevalencia de niños sin historia de caries a los 2 años es de un 82,5%, luego disminuye a un 50,4 % a los 4 años y alcanza un 29,6 % en escolares de 6 años de edad (MINSAL, 2007; MINSAL, 2012). Mientras que en adultos mayores el porcentaje sin historia de caries es de un 0%. En la encuesta nacional de salud del año 2016 – 2017 se observa un 54,6% de dientes afectados con caries cavitadas (MINSAL, 2018), lo cual demuestra la prevalencia de la enfermedad y esto sin considerar el porcentaje de caries no cavitadas que se pueden cavitar a futuro.

Esta situación ha sido reconocida a nivel mundial, siendo actualmente la salud bucal considerada como una de las prioridades en salud, tanto por sus características epidemiológicas como por la percepción e impacto de estas (Pitts y cols., 2017).

A medida que han pasado los años, varios han sido los productos utilizados en la prevención de esta enfermedad, actualmente el más utilizado es el flúor, el cual lo podemos encontrar en el agua potable, pastas dentales y barnices (Mendoza, 2007; Phantumvanit y cols., 2017). Sin embargo este, por sí solo, no ha sido muy eficaz para prevenir completamente la caries (Cannon y cols., 2019). Es por esto que varios investigadores han estudiado diferentes microorganismos vivos, llamados probióticos, los cuales, han demostrado que pueden tener un papel fundamental en la cavidad oral y en la prevención de la enfermedad de caries (Seminario y cols., 2017).

## **2.2 Caries y biopelícula**

La caries dental es un proceso químico-biológico reversible que inicia como desmineralización localizada de tejidos duros del diente, bajo el efecto del ácido producido por bacterias, las cuales metabolizan el azúcar (Barrington y cols., 2019). Estas bacterias pertenecen a la biopelícula oral y son omnipresentes en las poblaciones de todo el mundo (Fejerskov, 2004).

Esta biopelícula se forma a partir de una delgada membrana biológica acondicionadora de proteínas y glicoproteínas que derivan principalmente de la saliva, junto con líquido crevicular y componentes bacterianos, llamada película adquirida (PA), la cual se encuentra en la superficie dental (Zero, 1999). Esta membrana proteica desempeña importantes funciones relacionadas con la integridad del diente, por ejemplo: regula el arribo a la superficie dental de ácidos procedentes de la alimentación o formados durante el metabolismo microbiano, previniendo de tal modo la desmineralización, así como también provee un medio para el intercambio de iones calcio y fosfatos durante los procesos de remineralización. Si bien cumple importantes funciones protectoras, la PA también provee sitios para la adhesión de microorganismos bucales, permitiendo la unión inicial en los eventos de formación de la biopelícula, estructura cuya presencia es condición necesaria para el posterior desarrollo de la enfermedad de caries (Melchora, 2007).

Finalmente llegan especies colonizadoras secundarias, las cuales se adhieren a los primeros colonizadores, y así aumenta la complejidad de la biopelícula, esta sufre un proceso de maduración con la formación de una matriz, que se compone de exopolímeros bacterianos (polímeros secretados en el medio externo) junto con polisacáridos derivados del metabolismo del azúcar y el ADN. Esta matriz ayuda a retener la biopelícula en la superficie dental y puede influir en la penetración y movimientos de moléculas dentro de la biopelícula (Zero, 1999).

El proceso dinámico de caries consiste en períodos alternos de desmineralización y remineralización dental. Si la desmineralización neta ocurre en un tiempo mayor que el proceso de remineralización, resultará en el inicio de lesiones de caries. Es importante equilibrar las características patológicas y protectoras. Los factores patológicos influyen en la iniciación y progresión de la caries dental, mientras que los factores protectores promueven la remineralización y detención de lesiones (Subramaniam y Telegeti, 2017).

Múltiples son los factores asociados a la presencia de caries, dentro de los cuales encontramos: higiene bucal, susceptibilidad individual, exposición a fluoruros y hábitos alimenticios (Sosa, 2003). Estos factores pueden influir negativamente en el equilibrio fisiológico entre el diente y la biopelícula, disminuyendo así el pH, provocando una pérdida neta de minerales, comenzando así con la enfermedad de caries (Fejerskov, 2004).

### **2.3 Esmalte dental**

Los dientes son tejidos altamente mineralizados presentes en un gran número de vertebrados y cumplen la función básica de trituración de los alimentos (Whitey cols., 2001). Estos se componen de diferentes tejidos, entre los cuales se encuentran: esmalte, dentina, cemento y pulpa.

El esmalte dentario se forma en el órgano de esmalte del germen dentario y las células productoras de este tejido son los ameloblastos (Albertí y cols., 2007). Este es el tejido más duro y altamente mineralizado del cuerpo humano. Gracias a su

elevada dureza, alta tenacidad y ubicación más externa en el diente, permite la protección de la dentina y pulpa, que se encuentran en su interior, de daños externos (Rivera y cols., 2012). Está compuesto por aproximadamente 96% de mineral (principalmente Hidroxiapatita (HA) carbonatada) y 4% de material orgánico (1% de proteína y 3% agua) (Bajaj D. y Arola D., 2009). La porción mineral está fundamentalmente conformada por ejes de HA de tamaño nanométrico (~25 nm de espesor y ~100 nm de ancho) que se combinan sistemáticamente para formar estructuras alargadas (similar a fibras) de unos 4-8  $\mu\text{m}$  de diámetro llamadas prismas, que se extienden desde la unión amelodentinaria hasta la superficie oclusal.

Este tejido presenta diferentes características, dentro de las cuales encontramos: densidad mineral promedio de  $2,95 \text{ g/cm}^3$ , módulo de elasticidad en un rango entre 70 y 120 gigapascal (GPa), dureza varía entre 3 GPa y 6 GPa dependiendo de la edad del paciente y la localización en el diente y una tenacidad a la fractura reportada entre 0,4 y 1,5 megapascal (MPa) (Rivera y cols., 2012).

La permeabilidad del esmalte es escasa, sin embargo, permite el flujo de iones y agua presentes en el medio oral. Posee la propiedad de una captación continua de ciertos iones presentes en la saliva, de esta manera algunos elementos presentes en la saliva se pueden incorporar al esmalte (Gómez, 1999).

## **2.4 Desmineralización - Remineralización**

La caries dental es un proceso dinámico que es causado por períodos alternos de desmineralización-remineralización. La desmineralización se refiere a la pérdida de minerales (principalmente iones de calcio y fosfato) de la hidroxiapatita dental debido a la exposición a compuestos ácidos, mientras que la remineralización es un proceso en el cual los minerales son retornados a la estructura molecular del diente (Subramaniam y Telegeti, 2017).

Existe interacción de tres factores principales que interfieren en este proceso: el hospedero (higiene bucal, la saliva y los dientes), la biopelícula (bacterias) y el

sustrato (dieta cariogénica). Además de estos factores, debe tenerse en cuenta uno más, el tiempo (Núñez y García 2010).

La estructura del diente se desmineraliza por ácidos orgánicos producidos por bacterias, las cuales metabolizan los carbohidratos fermentables, principalmente azúcares. El principal ácido involucrado en este proceso es el ácido láctico. Estos se acumulan en la superficie dental, lo que provoca un descenso del pH hasta un punto en que las condiciones de equilibrio se ven sobrepasadas, generando una insaturación. La pérdida de mineral conduce a una mayor porosidad, ampliación de los espacios entre los cristales de esmalte y ablandamiento de la superficie (Zero, 1999). Una vez que los azúcares se eliminan de la boca gracias a la deglución y la dilución salival, los ácidos producidos por la biopelícula pueden ser neutralizados, principalmente por la acción amortiguadora de la saliva, lo que provoca que el pH de la biopelícula regrese hacia la neutralidad y se vuelve suficientemente saturado con calcio, fosfato y iones fluoruro para que la desmineralización se detenga y vuelva a depositarse el mineral. Es decir, el sistema de remineralización y desmineralización es un proceso de equilibrio dinámico, que en condiciones de salud, este se encuentra desplazado hacia la remineralización, mientras que, cuando el pH decae a 5.5 (denominado pH crítico) este se desplaza hacia la desmineralización y comienza la disolución del esmalte. Este valor varía de forma individual entre pacientes, por lo tanto es un valor promedio. Cuando el pH sube nuevamente, por sobre 5.5, la remineralización ocurrirá. (Lussi y cols, 2004, Sampaio de Melo M.A y cols, 2016)

Para prevenir la aparición de lesiones de caries, el objetivo principal es mantener la homeostasis mineral de las superficies dentales. Por ende es importante equilibrar lo patológico y los factores de protección que influyen en el inicio y progresión de la caries dental, intentando promover en mayor medida los factores protectores de la remineralización y así lograr la detención de la lesión.

## 2.5 Probióticos

Actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) los ha definido como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedero" (OMS 2002).

Tradicionalmente, los probióticos se han utilizado para la prevención y el tratamiento de infecciones o enfermedades gastrointestinales. Sin embargo durante los últimos 20 años se han estudiado para combatir enfermedades orales mediadas por biopelículas, como la caries dental y gingivitis/periodontitis (Hasslöf y Stecksén 2020). Dentro de las principales especies aisladas y desarrolladas se encuentran algunas del género *Lactobacillus* como *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LB21, *L. reuteri*, *L. paracasei*, *L. brevis* CD2 y de otros géneros como *Bifidobacterium* spp. (Cagetti et al., 2013). Las cuales promueven un aumento en el pH oral, una disminución en el recuento de bacterias patógenas acidogénicas y a la vez compiten por nichos ecológicos.

Se presume que los probióticos presentan distintos mecanismos de acción, dentro de los cuales se incluyen: interferencia con otros microorganismos; capacidad de excluir o inhibir los patógenos y la modulación de las respuestas inmunes del hospedero que produce efectos locales y sistémicos. El efecto local es el efecto que tienen las bacterias probióticas cuando interactúan con otras bacterias en la biopelícula y dificultan el crecimiento de los patógenos, principalmente mediante la producción de peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y ácidos orgánicos (Tvetman y cols., 2017). Sin embargo, es importante enfatizar que los mecanismos de acción detallados no se conocen completamente y que existen informes contradictorios sobre los efectos inducidos por los probióticos en la respuesta del entorno oral.

Los vehículos comunes para la administración de los probióticos son los productos lácteos (leche, yogur, crema agria) o tabletas, cápsulas, pastillas y gotas. Principalmente por ser de fácil consumo, aunque desafortunadamente, no se ha

establecido ninguna dosis "óptima" para el cuidado oral (Hasslöf y Stecksén 2020).

Dentro de las diferentes especies de probióticos, la primera en ser investigada fue *L. rhamnosus GG*, en donde se estudió el efecto de las bacterias probióticas en el riesgo de caries y el desarrollo de caries en niños en edad preescolar mediante el consumo de leche suplementada con *L. rhamnosus GG* (Näse y cols., 2001), en donde se demostró efectos beneficiosos sobre los factores de riesgo de caries. Debido a esto, aumento el interés en esta especie y a través de los años se han hecho diferentes investigaciones.

Además, un estudio realizado en Chile, demostró que la ingesta regular de leche suplementada con probiótico *L. rhamnosus SP1* reduce la prevalencia de caries, incidencia de nuevos niños con lesiones de caries e incidencia de nuevos dientes con lesiones de caries tanto cavitadas como no cavitadas al compararlos con un grupo control (Rodríguez et al., 2016).

Últimamente se logró determinar que la producción de biosurfactantes por *L. rhamnosus GG*, pueden modificar el nivel de expresión de los genes de virulencia, las propiedades superficiales de las células bacterianas y reducir sus capacidades adhesivas y también interferir con el desarrollo de biopelículas y la comunicación de célula a célula (Tahmourespour y cols., 2019). Lo cual indica que puede ser utilizado para evitar la formación de una biopelícula acidogénica y en consecuencia, influir en la prevención de la enfermedad de caries dental.

## **2.6 Modelos *in situ* de caries**

Para comprender los procesos de la naturaleza necesitamos modelos que capturen elementos esenciales de una situación particular que se quiere estudiar. Tal modelo debe ser reproducible y confiable. Las ciencias biomédicas se basan en diferentes modelos experimentales para poner a prueba las hipótesis: modelos *in vivo*, *in vitro* e *in situ*.

Los modelos *in situ* se han estado utilizando como herramienta desde hace años

en el área de la odontología, como también en estudios recientes (Lingstrom y cols., 1994; Kashania y cols., 1998; Akemi y cols., 2015; Kalina y cols., 2018). Específicamente los modelos de caries *in situ* implican el uso de aparatos u otros dispositivos que crean condiciones definidas en la boca humana, que simulan el proceso de caries dental. Los modelos *in situ* deberían servir como puentes entre los recursos naturales, la situación clínica no controlada y la situación de laboratorio altamente controlado, confiando en las propias bacterias del paciente para colonizar los especímenes (Zero, 1995).

Debido a que la enfermedad de caries es un proceso multifactorial, estos modelos deben incluir: un sustrato dental, ya sea esmalte o dentina; la formación o presencia de biopelícula con potencial cariogénico; presencia de carbohidratos, ya sea controlado experimentalmente o provisto por el sujeto con su dieta normal; y tiempo, determinado por la duración del período experimental.

Las principales ventajas de los modelos *in situ* es que son realizados en la boca humana en contraste con los modelos de laboratorio *in vitro* o experimentación en animales. Además, los modelos *in situ* facilitan el control de las variables experimentales y una flexibilidad en el diseño experimental. Mientras que las desventajas es que debido a que se realiza en humanos el número de sujetos que puede estar involucrado generalmente es más limitado, además que el estudio depende del cumplimiento por parte de los sujetos de prueba.

## **2.7 Planteamiento del problema**

La caries es un problema de salud pública mundial dada su alta prevalencia, afectando aproximadamente 3,9 mil millones de personas en todo el mundo (Listl y cols., 2015), además esta patología no solo afecta físicamente a la población, sino que también se ve afectada su calidad de vida.

Antiguamente se realizaba el tratamiento cuando la caries ya se encontraba cavitada, lo que significaba realizar una remoción completa del tejido infectado (Innes y cols, 2019). Hoy en día, la odontología contemporánea se basa en la



odontología mínimamente invasiva, la cual se enfoca en la prevención y remineralización de estas lesiones de caries en su etapa inicial. Es por esto que surge la necesidad de prevenir con mayor eficacia la ocurrencia de esta enfermedad y el uso de probióticos podría ser una opción terapéutica que complemente los tratamientos preventivos clásicos.

Dado lo anterior, este trabajo de investigación propone estudiar el efecto del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* administrado en formato tópico/sistémico sobre la densidad mineral, dureza superficial y morfología superficial de bloques de esmalte insertos en un modelo *in situ* de caries, para determinar de mejor forma su efecto benéfico/protector frente a procesos de desmineralización.

### III. HIPÓTESIS

Existen diferencias en la microdureza superficial, densidad mineral y morfología superficial de bloques de esmalte insertos en un modelo *in situ* de caries luego de la administración de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formato tópico/sistémico comparado con bloques de esmalte expuestos exclusivamente a sacarosa.

### IV. OBJETIVO GENERAL

Establecer las diferencias en la microdureza superficial, densidad mineral y morfología superficial de bloques de esmalte de un modelo *in situ* de caries luego de la administración de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formato tópico/sistémico comparado con bloques de esmalte expuestos exclusivamente a sacarosa

### V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la microdureza superficial, densidad mineral y describir la morfología superficial de los bloques de esmalte de un modelo *in situ* de caries en un grupo expuesto a probiótico en formato tópico/sistémico.
2. Determinar la microdureza superficial, densidad mineral y describir la morfología superficial de los bloques de esmalte de un modelo *in situ* de caries en un grupo no expuesto a probiótico en formato tópico/sistémico.
3. Comparar la microdureza superficial, densidad mineral y morfología superficial de los bloques de esmalte de un modelo *in situ* de caries entre el grupo expuesto al probiótico en formato tópico/sistémico y el grupo no expuesto a probiótico en formato tópico/sistémico.

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Aspectos éticos

Este proyecto se rige por los principios de la Declaración de Helsinki, se encuentra dentro del marco legal que regula a los ensayos clínicos en Chile y cuenta con la aprobación del comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (ACTA N°2016/30)(Anexo 1).

Se solicitó la firma de un documento de consentimiento informado (Anexo 2) a los voluntarios de manera que su participación fuera voluntaria e informada. El documento detalla el propósito del estudio, su duración, procedimientos requeridos, posibles riesgos y el contacto del equipo investigador.

### 6.2 Diseño experimental

El modelo *in situ* de caries consistió en 14 sujetos voluntarios, todos fueron clínicamente evaluados a través de un examen intraoral de tejidos blandos y duros, esto fue realizado por un examinador y se registró en una ficha clínica (Anexo 3). Éstos utilizaron un dispositivo intraoral por 14 días que sirvió de plataforma para 5 bloques de esmalte humano que se prepararon y montaron en un aparato removible. La construcción de la muestra correspondió a los bloques de esmalte insertos en el dispositivo intraoral.

Los voluntarios usaron el aparato con 5 bloques de esmalte, los cuales se encontraban protegidos por acrílico con un espacio de 1 mm para la acumulación de placa o biopelícula (Cury JA et al.,1997), al bloque de esmalte ubicado en palatino del aparato se le cubrió la mitad con esmalte para uñas (Colorama) para aislarlo del medio oral; este fue el grupo control negativo. Los voluntarios debieron utilizar los aparatos día y noche, solamente retirarlo de

boca durante los momentos de higiene oral, alimentación y para aplicar los tratamientos indicados que dependieron del grupo de experimentación correspondiente. Los voluntarios fueron asignados a 2 grupos de experimentación en forma aleatoria con la función aleatorio de Excel office 2012.

Criterios de inclusión: Contar con una buena salud oral, es decir, con más de 22 piezas dentarias naturales en boca, libres de enfermedad periodontal y gingival, índice COPD menor a 8, libres de lesiones de caries sin tratar (C=0) y tasa de flujo salival normal.

Criterios de exclusión: Fumadores, individuos que se hayan sometido a tratamientos antibióticos o antisépticos bucales en un plazo de seis meses previos a la fecha de ingreso al estudio, que presenten alteraciones en el flujo salival, consumo de fármacos y/o con intolerancia a los materiales de estudio (Acrílico), embarazo, el uso de enjuagues bucales antibacterianos o antibióticos durante los últimos 6 meses, así como signos de periodontitis destructiva o signos inflamatorios.

### **6.3 Construcción de la muestra**

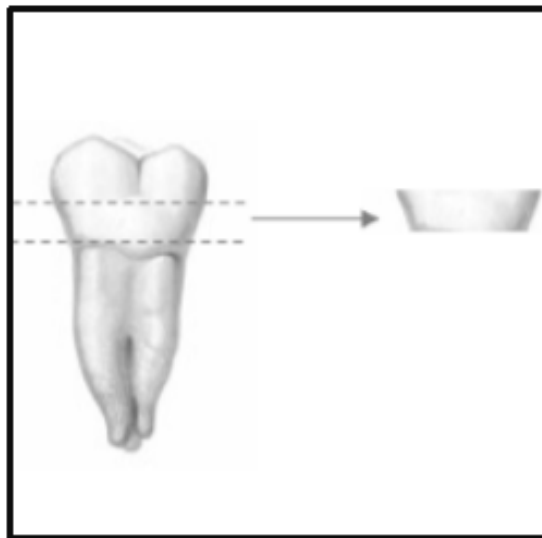
Para el cálculo del tamaño de muestra, se decidió que el tamaño de muestra que se ajusta mejor al modelo se lograba cuando se utilizaba la medición de microdureza superficial. Se consideró un riesgo alfa de 0,05 y un riesgo beta de 0,2 en un contraste bilateral. Se asume una desviación estándar común de 15,3 (Salehzadeh E y cols., 2015), con una tasa de pérdidas de seguimiento del 5%, y un poder estadístico de 80 %. Se precisan 18 unidades de observación correspondientes a bloques de esmalte en cada grupo para detectar una diferencia igual o superior a 15 unidades de microdureza Vickers. El número final de unidades de observación por grupo fue de 40 puesto que en la mayoría de los modelos *in situ* donde se estudió satisfactoriamente la lesión de caries se utilizaron dichos valores (Sa 2013; Arruda 2012; Higham 2005).

#### 6.4 Obtención y almacenamiento de los dientes

Se recolectaron 40 terceros molares incluidos que fueron donados voluntariamente por pacientes con indicación de extracción mediante un consentimiento informado (Anexo 4). Los molares se mantuvieron en solución de Timol 0,1% pH 7, por un mes (Cury JA et al., 1997). Para luego ser sometidos a autoclave a vapor por 60 min a 120°C para asegurar su esterilización.

#### 6.5 Preparación de los bloques de esmalte

Los bloques vestibulares y palatinos se obtuvieron mediante el corte de los terceros molares incluidos con un disco diamantado. Se utilizó solamente el tercio medio de la corona del diente, descartándose las raíces y el tercio oclusal (Figura 1). Se obtuvieron 72 bloques vestibulares de 3x3x3 mm y 18 bloques palatinos de 6x3x3 mm.



**Figura 1.** Esquema muestras de esmalte. Utilización de tercio medio coronal.

## 6.6 Obtención y diseño del dispositivo intraoral

Se tomaron impresiones con alginato del maxilar de los voluntarios con cubetas stock y luego fueron enviadas a un laboratorio dental donde se realizaron los dispositivos intraorales conacrílico de termopolimerización. Los dispositivos constaban de dos plataformas deacrílico en la zona vestibular de los molares superiores y una plataforma deacrílico en la zona de las rugas palatinas las que dieron sostén a los bloques de esmalte anteriormente descritos. El dispositivo constó de 4 ranuras de 4x4x4 mm en donde dos de ellas se alojaban en la plataforma vestibular derecha y las otras dos en la plataforma vestibular izquierda, y 1 ranura de 7x4x4 mm al centro de la plataforma palatina (Figura 2). Los bloques de esmalte fueron montados individualmente usando cera adhesiva de alta fusión. Los bloques de esmalte a su alrededor, poseían un espacio de 1 mm con elacrílico para la acumulación de placa o biopelícula (Cury y cols., 1997) en las zonas vestibulares de molares.

En las muestras ubicadas en la zona palatina, la mitad derecha de la muestra fueron revestidas con esmalte de uña transparente, usando esta superficie como un control.

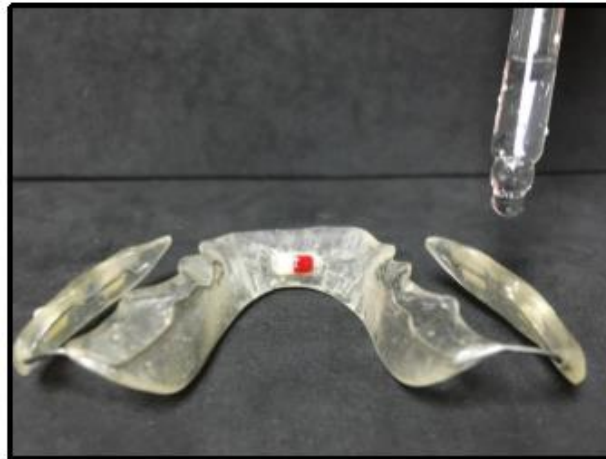


**Figura 2.** Dispositivo intraoral con bloques de esmalte. Aparato utilizado por los voluntarios.

## 6.7 Fase clínica de los grupos experimentales

La experimentación constó de dos grupos de 7 personas cada uno; un grupo expuesto a probiótico tópico/sistémico y sacarosa y un grupo control positivo expuesto a sacarosa y no al probiótico. Ambos grupos debieron aplicar a cada una de las muestras ubicadas en palatino y vestibular, una gota de sacarosa al 20% (Aires y cols., 2006), como desafío cariogénico, cada 2 horas hasta lograr 8 aplicaciones diarias (Cury y cols., 1997). La aplicación se realizó mediante un gotario fuera de boca y se debió volver a introducir el dispositivo de forma inmediata.

El grupo A expuesto al probiótico de manera tópica/sistémica debió ingerir una dosis de 150 mL de agua en la que se suspendió una dosis liofilizada de *Lactobacillus rhamnosus* SP1 (Sacco, Italia) en una concentración de  $10^8$  UFC/mL preparada dos horas antes de su ingesta con el dispositivo intraoral en boca. Por otra parte, el grupo B no recibió ningún tratamiento sobre sus superficies de esmalte, solo, debía cumplir con el desafío cariogénico (Figura 3).



**Figura 3.** Desafío cariogénico. Instilación de una gota de sacarosa al 20% cada 2 horas 8 veces al día sobre los bloques de esmalte.

Las instrucciones de uso del dispositivo y la forma de aplicación de los tratamientos fueron entregadas de forma oral y escrita con un diagrama para mayor claridad. (Anexo 5). El dispositivo intraoral fue usado día y noche, durante 14 días continuos, sólo podía ser retirado durante los momentos de higiene oral y alimentación, además de la aplicación del tratamiento tópico indicado. El dispositivo solo podía permanecer fuera de boca, dentro de un contenedor plástico con humedad (gasa o papel húmedo), por un tiempo máximo de 30 minutos sólo 3 veces al día.

La evaluación del compromiso y cumplimiento por parte de los voluntarios se realizó mediante una pauta escrita en la cual, a conciencia, detallaron el desempeño individual en cuanto a la aplicación de la sacarosa y/o probiótico (Anexo 6), el uso y comodidad del dispositivo (Anexo 7).

### **6.8 Recolección de dispositivos**

Las muestras fueron retiradas de los dispositivos intraorales y almacenadas en tubo centrífuga tipo Eppendorf con Timol al 0.1% por 48 horas para rehidratar las muestras. Estos tubos fueron previamente rotulados según el grupo experimental (muestras expuestas al probiótico tópico/sistémico y a sacarosa; muestras expuestas solamente a sacarosa). A las muestras palatinas de ambos grupos experimentales se les retiró el esmalte de uña y se les realizó una incisión para identificar la mitad aislada del medio oral. Estas últimas fueron analizadas tanto por superficie aislada del medio oral como por superficie expuesta según grupo experimental. Finalmente, los bloques de esmalte fueron testeados en diferentes pruebas.

### **6.9 Microdureza superficial de Vickers (MSV)**

Una vez terminado el proceso experimental de 14 días, se procedió a medir la microdureza superficial de cada bloque de esmalte con el microindentador de Vickers Struers Duramin (USA) proporcionado por el Laboratorio de Ciencias de los Materiales (Figura 4), en donde a los especímenes de esmalte se les penetró



con una carga de 200 g (1,961 N) durante 10 segundos. Las indentaciones se realizaron aleatoriamente sobre la superficie de esmalte previa rehidratación de las muestras en Timol al 0,1% por 48 horas como mínimo. Se realizaron 5 mediciones en cada bloque de esmalte obteniendo de esta forma un promedio de microdureza por superficie. Los valores de microdureza fueron calculados por el equipo mediante la siguiente fórmula:

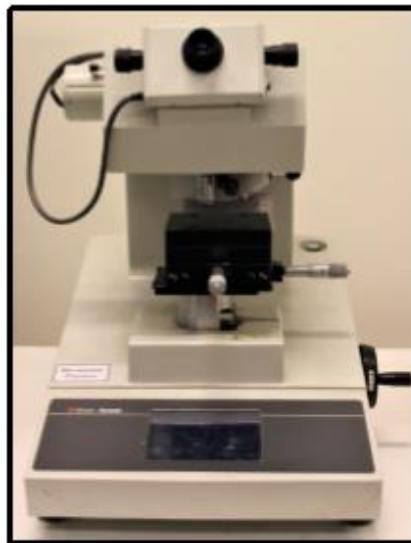
$$\text{Microdureza Vickers (VH)} = 1,854 \times F \times 10^{-3} / d^2$$

HV: microdureza de vickers

F: test de carga aplicada (N)

d: promedio de las diagonales de la indentación

(Majithia et al., 2016)



**Figura 4.** Microindentador de Vickers Struers Duramin (USA).

### **6.10 Microtomografía computarizada (Micro- CT) y densidad mineral**

Luego del cumplimiento del desafío cariogénico de instilar una gota de sacarosa al 20% y el consumo del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formato tópico/sistémico por 14 días, bloques de esmalte palatinos de ambos grupos experimentales fueron escaneados por la tomografía microcomputada de alta resolución (Skyscan 1278, Aartselaar, Bélgica). La calibración del nivel de gris fue logrado utilizando el esmalte de las muestras control como guía para

determinar los valores de densidad mineral de diferentes partes del diente .

Las imágenes obtenidas se guardaron con el formato Tagged Image File Format (TIFF) las que luego se exportaron al software NRecon, Versión: 1.7.4.2; SkyScan para visualizar los cortes y las reconstrucciones volumétricas de los bloques de esmalte. Se utilizó el software CT Analyser versión 1.18.4.0 para la cuantificación de densidad mineral (DM) realizando un análisis solo al esmalte de las muestras. Los valores de densidad mineral (DM) se promediaron luego de hacer las mediciones por cada bloque de esmalte. Las imágenes se visualizaron en 3D y con codificación de colores mediante el programa DataViewer versión 1.5.6.2., obteniendo las densidades minerales y su distribución en el esmalte dental sometido a los distintos grupos experimentales.

### **6.11 Microscopia electrónica de barrido (MEB)**

La observación de la microestructura de los bloques de esmalte se realizó mediante el microscopio electrónico de barrido (JEOL Modelo JSM IT300LV) que se encuentra ubicado en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Las muestras se fijaron con glutaldehído al 2,5 % y en buffer cacodilato de sodio 0,1 M por 2 horas, luego fueron lavadas 3 veces por 5 minutos y secadas por aproximadamente 30 minutos. Luego fueron montadas en un portamuestras de aluminio para posteriormente ser metalizadas en oro (METALIZADOR DENTON VACUMN). Se obtuvieron imágenes a aumentos de 1000X y 2000X en su plano transversal.

### **6.12 Análisis estadístico**

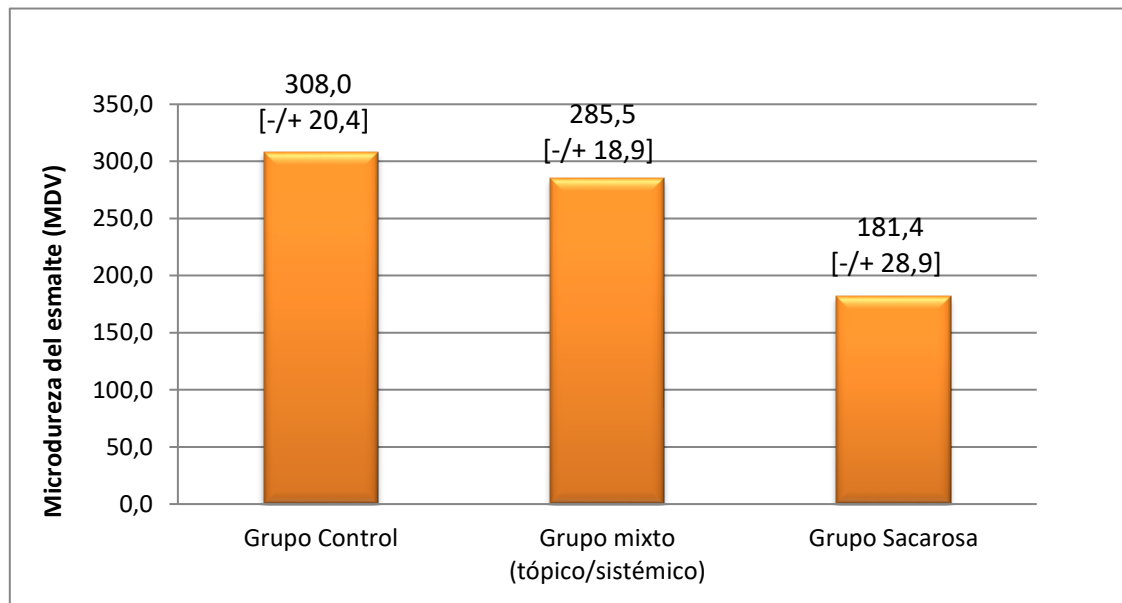
Los datos fueron codificados e ingresados a una base de datos por un solo operador en archivo Excel Office 2012 para Windows. Luego se realizó una prueba T Test (Student's T-Test) para el análisis estadístico. Se desarrolló un análisis descriptivo de los datos de microdureza y densidad mineral de las muestras pertenecientes a cada grupo experimental. Se realizó una comparación de datos entre los grupos de muestras probiótico/sacarosa y

sacarosa, teniendo como valores referenciales de magnitud los obtenidos de las muestras aisladas del medio oral. Las variables cuantitativas presentaron valores con Intervalo de confianza de un 95%. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas si el valor del p-value obtenido en el test es igual o menor a 0,05.

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Microdureza Superficial

El gráfico 1 (Figura 5) muestra los promedios de las mediciones de microdureza superficial de los bloques de esmalte sometidos al probiótico *Lactobacillus rhamnosus* de manera tópico-sistémico/sacarosa, bloques sometidos exclusivamente a sacarosa y bloques control.



**Figura 5. Gráfico 1.** Promedios de microdureza superficial de los bloques de esmalte según grupo de muestra. Los valores entre corchetes representan las desviaciones estándar (DE ±). Los valores promedios de microdureza superficial son distintos entre los 3 grupos (Grupo Control; 308,0 ± 20,4 MDV, Grupo mixto; 285,5 ± 18,9 MDV, Grupo Sacarosa; 181,4 ± 28,9 MDV).

El mayor valor promedio de microdureza superficial pertenece al grupo control (n: 50 unidades de observación), seguido del grupo expuesto al probiótico *Lactobacillus rhamnosus* de manera tópico/sistémico y sacarosa (n: 150 unidades de observación), mientras que el grupo sometido exclusivamente a sacarosa fue el que presentó menor valor (n: 45 unidades de observación). Al comparar los

valores promedios entre los dos grupos experimentales se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) entre el grupo de muestras expuestas al probiótico *Lactobacillus rhamnosus* de manera tópico/sistémico y sacarosa y el grupo de muestras expuestas exclusivamente a sacarosa. Para tener una referencia de magnitud se obtuvo además el promedio del grupo control cuyo valor fue de  $308,0 \pm 20,4$  (Tabla 1).

Grupo experimental	Valor promedio de microdureza	DE $\pm$	Valor P entre grupo P/S - S
Control (C)	308,0	20,4	
Probiótico(tópico/sistémico)/Sacarosa (P/S)	285,5	18,9	P < 0.05
Sacarosa (S)	181,4	28,9	

**Tabla 1.** Promedios de grupos experimentales probiótico (tópico/sistémico) /sacarosa y sacarosa, además, valor referencial de magnitud de muestras aisladas del medio oral (control negativo), desviaciones estándar y valor de significancia entre grupo probiótico (tópico/sistémico)/sacarosa y sacarosa.

## 7.2 Espesor del esmalte (micro-CT) y Densidad Mineral

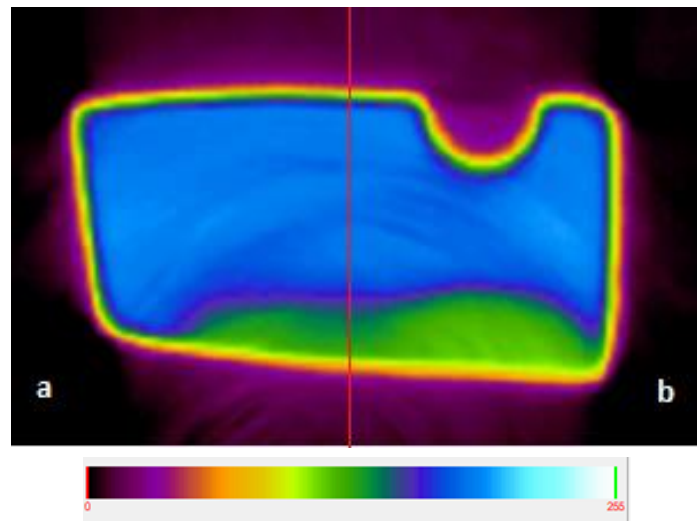
### Análisis cuantitativo del espesor del esmalte

Se escogieron las muestras ubicadas en la zona palatina del aparato intraoral, las cuales nos permitieron comparar ambas superficies del bloque de esmalte, dependiendo del grupo experimental, tanto la superficie control (no expuesta al medio oral) y superficie expuesta al *probiótico Lactobacillus rhamnosus* tópico/sistémico y sacarosa (figura 6), como también la superficie control y superficie expuesta solamente a sacarosa (figura 7).

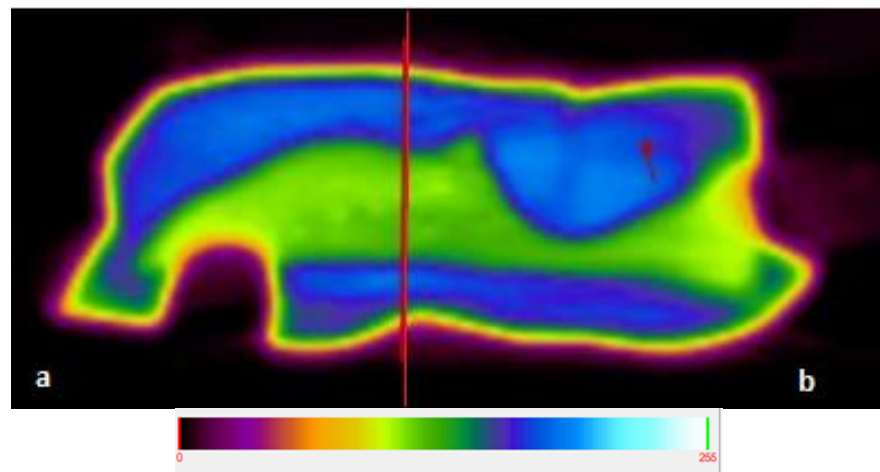
Se expone de manera cuantitativa las diferencias en la densidad mineral entre los tejidos, a través de diferencias en la gama de colores, los cuales representan mapas de densidad mineral normalizada, que muestran la distribución y los niveles de densidad mineral dentro de las áreas de la lesión y el esmalte sano, siendo los colores azules y celestes las áreas más mineralizadas del esmalte, el azul oscuro y violeta corresponden a regiones desmineralizadas del esmalte y el sector verde-amarillo corresponde a dentina.

Se puede observar en la imagen de la muestra palatina del grupo experimental mixto (figura 6), en la superficie de la muestras, un área de desmineralización en la zona tratada (figura 6.a), la cual está representada por un color azul oscuro y violeta que fue similar en distribución y cantidad a su contraparte, la zona de control (Figura 6.b), por lo que se infiere que no hubo mayores alteraciones comparativamente.

Mientras que en la imagen de la muestra palatina del grupo experimental sacarosa (figura 7), se puede observar, en la superficie de la muestra, colores azules más oscuros en la región tratada con sacarosa (imagen 7.b) lo que es congruente con desmineralización, en comparación con la región no tratada (imagen 7.a), la cual no presenta alteraciones en su espesor, por lo que se infiere que si hubo mayores alteraciones comparativamente.



**Figura 6.a.b:** Imágenes de micro-CT de una muestra palatina después de 14 días de ser sometidas a sacarosa y probiótico tópico/sistémico. El recuadro “a” corresponde a la zona expuesta al probiótico y sacarosa, mientras que el recuadro “b” corresponde a la zona no expuesta al medio oral.



**Figura 7.a.b:** Imágenes de micro-CT de una muestra palatina después de 14 días de ser sometidas a sacarosa. El recuadro a corresponde a la zona control, la cual no fue expuesta al medio oral, mientras que el recuadro b corresponde a la zona expuesta a sacarosa.

### **Cuantificación de la densidad mineral**

Con respecto a la evaluación de la densidad mineral de las muestras, se ve una diferencia en los valores promedios en los tres grupos (tabla 2). La densidad

mineral de las muestras control, las cuales no fueron expuestas al medio oral, fue mayor en comparación con los otros dos grupos, con un promedio de 2,54 gr/cm<sup>3</sup>, las muestras sometidas al probiótico *Lactobacillus rhamnosus* tópico/sistémico y sacarosa presentó un promedio de 2,49 gr/cm<sup>3</sup>, mientras que el grupo que presentó el menor valor de densidad mineral fue el grupo expuesto solamente a sacarosa, con un promedio de 1,94 gr/cm<sup>3</sup>.

Con respecto a dichos promedios se observa una diferencia significativa entre la densidad mineral del grupo probiótico (tópico/sistémico)/sacarosa y sacarosa ( $P < 0.05$ ) (tabla 2).

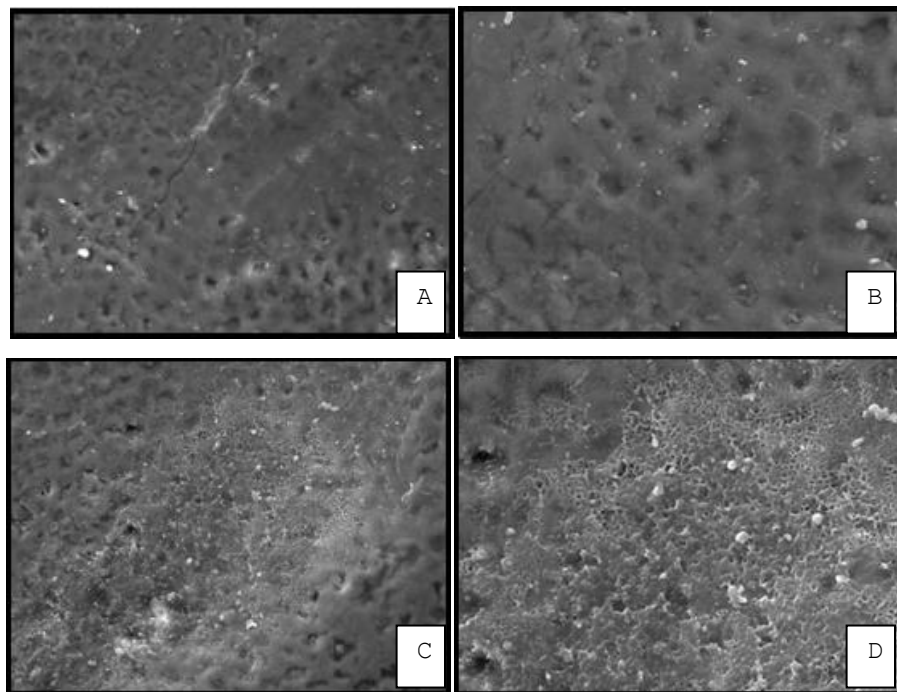
Grupo experimental	Promedio densidad mineral del esmalte (gr/cm <sup>3</sup> )	DE ±	Valor P entre grupo P/S - S
Control (C)	2,54	0,22	
Probiótico(tópico/sistémico)/Sacarosa (P/S)	2,49	0,12	P < 0.05
Sacarosa (S)	1,94	0,1	

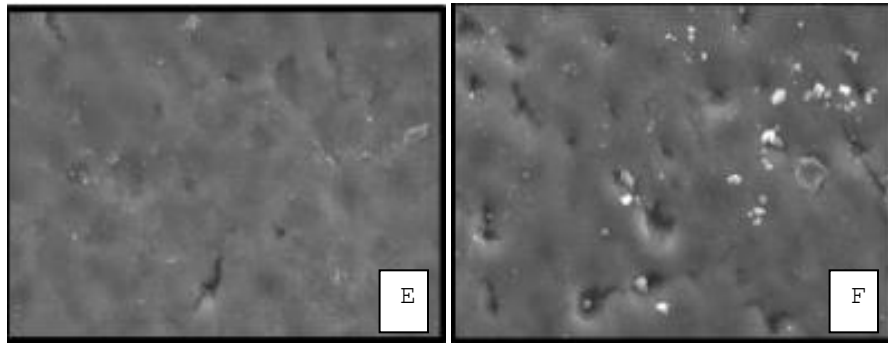
**Tabla 2.** Análisis descriptivo del promedio y desviación estándar de la densidad mineral de las muestras palatinas: superficie control, expuestas a probiótico tópico/sistémico y sacarosa y expuestas solamente a sacarosa. Además se muestra la comparación intergrupala del promedio de diferencia y significación (P) de la densidad mineral de las muestras palatinas de esmalte entre el grupo expuesto a probiótico tópico/sistémico y sacarosa y el grupo expuesto solamente a sacarosa.



### 7.3 Microscopia electrónica de barrido (MEB): Morfología superficial

Las muestras expuestas al microscopio electrónico de barrido fueron analizadas basándonos en los cambios morfológicos observados en la superficie del esmalte. Se tomaron las imágenes más representativas con el fin de poder realizar una comparación sobre su morfología superficial. Se puede observar en la figura 8, en la primera imagen, una micrografía de una muestra de esmalte perteneciente al grupo control (A-B), en donde se observa una superficie lisa con pequeños poros poco marcados, en la segunda imagen se observa una micrografía de una muestra de esmalte perteneciente al grupo mixto (expuesto al probiótico *Lactobacillus rhamnosus* tópico/sistémico y sacarosa) (C-D), en donde se puede observar una superficie de similares características en comparación con la superficie control. Mientras que en la tercera imagen, se observa una micrografía del grupo expuesto solamente a sacarosa (E-F), en donde se observa una superficie irregular, con poros mas marcados, lo que indica una mayor pérdida mineral en comparación con el grupo control y el grupo mixto.





**Figura 8.** Foto SEM de superficie de los bloques de esmalte. A-B corresponden a una muestra de esmalte control con una magnificación de 1000X (A) y de 2000X (B). C-D corresponden a una muestra de esmalte del grupo mixto con una magnificación de 1000X (C) y de 2000X (D) . E-F corresponden a una muestra de esmalte del grupo sacarosa con una magnificación de 1000X (E) y de 2000X (F).

## VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo de investigación a través de un modelo *in situ* de caries se expuso a un grupo de 14 voluntarios a la ingesta del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formato tópico/sistémico durante 14 días. Las muestras de esmalte obtenidas de los dispositivos intraorales que utilizaron los participantes fueron sometidas a una serie de pruebas para poder realizar una comparación entre tres grupos: grupo control negativo (no expuesto al medio oral), grupo experimental (expuesto a probiótico/sacarosa) y grupo control positivo (expuesto solamente a sacarosa) y así determinar el efecto del probiótico administrado en formato mixto en la prevención de la caries dental.

Los valores de microdureza obtenidos en este estudio revelaron que el valor promedio de las muestras de esmalte expuestas al probiótico de manera tópico/sistémico y sacarosa es considerablemente superior ( $285,5 \pm 18,9$ ) al promedio de los bloques de esmalte que solo fueron expuestos a sacarosa ( $181,4 \pm 28,9$ ), llegando esta diferencia a ser estadísticamente significativa. Por otro lado, los valores de microdureza del grupo experimental expuesto al probiótico fueron menores ( $285,5 \pm 18,9$ ) al compararlos con el grupo control negativo ( $308,0 \pm 20,4$ ), el cual no fue expuesto a sacarosa ni al probiótico. Los valores de la microdureza para los bloques de esmalte que fueron aislados del medio oral son similares a los obtenidos por Wongkhantee (2006), pero menores que los reportados por Mettu S. y cols (2015).

Los resultados cuantitativos de la densidad mineral mostraron que el grupo que presentó mayor valor fue el grupo control negativo ( $2,54 \text{ gr/cm}^3$ ), seguido del grupo expuesto al probiótico *Lactobacillus rhamnosus* de manera tópico/sistémico ( $2,49 \text{ gr/cm}^3$ ), y finalmente el grupo con menor valor fue el expuesto solamente a sacarosa ( $1,94 \text{ gr/cm}^3$ ). Además, se observó que el grupo mixto presentaba una superficie similar a la superficie del grupo control, a diferencia de lo que ocurrió al comparar el grupo expuesto a sacarosa, el cual presentaba una superficie más desmineralizada en comparación con el grupo control. Cabe destacar que los valores obtenidos de densidad mineral para el

grupo control (2,54 gr/cm<sup>3</sup>) son similares a los del estudio de Shahmoradi M. y cols (2017) y además actualmente no hay evidencia científica publicada que haya evaluado mediante Micro-CT el efecto de probióticos en modelos *in situ* en la superficie del esmalte dental, por lo cual no se pueden realizar comparaciones con nuestros resultados, sin embargo abre la posibilidad de estudiar los beneficios de los probióticos de una manera mínimamente invasiva.

Al analizar la morfología superficial en las imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de barrido, se observó que el grupo expuesto al probiótico *Lactobacillus rhamnosus* presenta similares características que el grupo control, en donde ambos presentaron una superficie lisa con pequeños poros poco marcados, a diferencia de lo que se observó en el grupo expuesto solamente a sacarosa, en donde se describió una mayor pérdida de tejido mineral, lo cual se ve representado en una superficie irregular, con poros más marcados. Lo cual viene a confirmar los resultados de microdureza observados en este estudio, ya que el grupo expuesto solamente a sacarosa al presentar una superficie irregular y más porosa, va a influenciar directamente en la pérdida de microdureza superficial, en comparación con el grupo expuesto al probiótico el cual no tuvo mayores cambios en su superficie y microdureza.

Al evaluar estos resultados, se sugiere que la administración tópica/sistémica del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* demuestra un efecto protector frente a la desmineralización, ya que presenta valores de microdureza y densidad mineral mayores que el grupo expuesto solamente a sacarosa, además, con relación a la morfología superficial, se observa en las imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de barrido, menor cantidad de poros y menos marcados al compararlo con el mismo grupo. Sin embargo, su efecto es limitado, puesto que no logra evitar completamente la pérdida de minerales del esmalte, lo cual está demostrado por presentar valores menores que el grupo control, el cual no fue expuesto al medio oral.

Para comparar nuestros resultados, en la literatura existen pocos estudios que hayan reportado haber utilizado un modelo *in situ* de caries para probar el efecto

de probióticos (Lodi 2015, Azán 2019, Colil 2019). Lodi et al el 2015, realizó un estudio con un modelo *in situ* de caries el cual 10 voluntarios fueron expuestos a leches fermentadas suplementadas con probióticos. La leche A contenía *Lactobacillus casei* y la leche B *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium spp.*, y *Lactobacillus paracasei*. La aplicación del probiótico se administraba de manera tópica fuera de boca por 5 minutos. En la prueba de microdureza se registraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras expuestas a sacarosa y las expuestas a la leche B, en donde este último grupo promedió valores mucho más altos que el grupo expuesto a sacarosa. Los valores de microdureza de este estudio, son similares a los valores obtenidos por nosotros. Aunque cabe señalar que tanto el vehículo como las cepas utilizados en dicho estudio fueron distintos a los empleados en este trabajo de investigación.

Colil et al el 2019, con un modelo *in situ* de caries demostró que el efecto de la aplicación tópica del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* evitaba la pérdida de microdureza y densidad mineral en comparación con muestras expuestas solamente a sacarosa, sin embargo, los valores obtenidos por ella fueron menores que los obtenidos por Azán et al el 2019, el cual, en vez de utilizar una aplicación tópica, utilizó una administración sistémica del mismo probiótico en un modelo de caries *in situ*. Los resultados de ambos autores, tanto valores de microdureza como densidad mineral, fueron menores a los obtenidos en este trabajo, el cual utilizó una administración tópica/sistémica. Lo cual indica que la vía de administración influye en la protección y prevención de lesiones de caries, siendo más efectiva la administración tópica/sistémica. Cabe destacar que tanto el vehículo como las cepas utilizados por ambos autores fueron los mismos a los empleados en este trabajo de investigación.

Realizar ensayos clínicos controlados aleatorizados requiere estudiar un gran número de sujetos durante un largo período de tiempo, para así establecer el efecto de una determinada intervención. Es por esto, que los estudios *in situ* surgen como una alternativa a estos estudios, ya que se pueden realizar con un pequeño grupo de participantes, en un período de tiempo mucho más corto, imponiendo muchas variables controlables (Sung y cols, 2014).

En los modelos *in situ* un grupo de voluntarios debe utilizar un dispositivo intraoral con muestras de esmalte, en donde los resultados de la investigación pueden ser testeados en ellas (Hollanders, 2018), estos modelos se han estado utilizando para investigar sobre la caries dental, tanto en la prevención (Ferreira & cols., 2020, Melo & cols., 2018, Kalina & cols., 2018), como en el tratamiento de esta (Jablonski & cols., 2019, Wierichsa & cols., 2020, Creeth & cols., 2016).

Los beneficios que trae el uso de un modelo *in situ* de caries es la reproducción y simulación de las condiciones intraorales no controladas, incorporando parámetros experimentales altamente controlados. Así como beneficios, también existen importantes limitaciones a considerar al utilizar este modelo, como por ejemplo el reclutamiento de voluntarios es un periodo de ardua búsqueda, que podría influir considerablemente en el tiempo del estudio. Una forma de combatir esta situación sería la incorporación de más muestras al dispositivo intraoral. Otro aspecto a considerar es el compromiso de parte de los voluntarios, que debe ser vigilado estrictamente por los investigadores, ya que el éxito de un estudio *in situ* depende en un gran porcentaje del cumplimiento de los participantes en la etapa experimental. La incomodidad al utilizar el dispositivo es un factor importante para tener en cuenta en lo que respecta al cumplimiento del protocolo, situación que se podría enmendar acortando los tiempos de experimentación, o realizando pruebas previas para que los voluntarios se acostumbren a su uso. Por lo tanto, para llevar a cabo un estudio *in situ*, se requiere de una minuciosa organización de parte del equipo de trabajo y una buena comunicación con el grupo de voluntarios para finalizar la experimentación con éxito.

En este trabajo de investigación participaron 14 voluntarios, lo cual coincide con 96 artículos publicados según una revisión sistemática realizada por Sung y cols., 2014. Además, se utilizaron muestras de esmalte humano, las cuales provinieron de terceros molares incluidos previamente recortados; esto puede ser considerado una desventaja de estos estudios, ya que obtener este tipo de dientes es muy complicado, tanto por motivos éticos, como por la extracción de

estos, ya que generalmente se realiza odontosección. Es por esto, que la utilización de dientes bovinos puede ser una alternativa, estos presentan mayor área de superficie y un grosor de esmalte más uniforme, no obstante, posee diferencias microestructurales puesto que el esmalte es más poroso. Por ende, se pueden utilizar como alternativa, pero siempre va a ser mejor realizar un estudio *in situ* con esmalte humano, ya que es mucho más representativo.

La elección de la cepa probiótica utilizada en este estudio se basa en la evidencia científica publicada anteriormente donde *Lactobacillus rhamnosus* exhibió propiedades interesantes contra bacterias cariogénicas, logrando disminuir la incidencia de caries en los voluntarios que fueron expuesto a él (Rodríguez 2016; Stecksén-Blicks 2009; Näse 2007). A modo general, se han descrito diferentes mecanismos de acción de los probióticos en la cavidad oral, como modular la respuesta inflamatoria (humoral y celular), producir sustancias como el peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, y competir con patógenos por superficies de adhesión y nutrientes (seminario y cols., 2017). En un estudio reciente en donde se utilizó *Lactobacillus rhamnosus* para inhibir la formación de biopelículas, se demostró que los biosurfactantes producidos por estos, pueden modificar el nivel de expresión de los genes de virulencia, las propiedades superficiales de las células bacterianas y reducir sus capacidades adhesivas y también interfieren con el desarrollo de biopelículas y la comunicación de célula a célula (Tahmourespour & cols, 2019).

La prueba de microdureza, utilizada en esta investigación, es un método confiable para obtener información sobre los cambios en el contenido mineral de los tejidos duros dentales. En esta, se mide la profundidad de penetración, el cual es un parámetro en el que se estudia la penetración de un material en la superficie del esmalte o en los túbulos dentinarios (Mandava y cols, 2017). Además, como la microdureza de la superficie del esmalte está relacionada directamente con su contenido mineral la hace una prueba ideal para permitir comparar el efecto de distintos productos para evitar el proceso de desmineralización.

Para evaluar los cambios minerales que ocurrieron en las superficies de las muestras dentarias se utilizó la Microtomografía Computarizada (Micro-CT), la cual es capaz de caracterizar la densidad mineral y los cambios estructurales de la lesión sin necesidad de seccionar o preparar la muestra, entregando resultados tanto cuantitativos, como cualitativos (Shahmoradi & cols. 2017). A diferencia de la técnica gold estándar para evaluar densidad mineral, la Microradiografía Transversa, la cual es una técnica destructiva que requiere la preparación de las muestras en secciones muy finas y una fuente de rayos X.

Este trabajo de investigación demostró que el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* administrado en formato tópico/sistémico protegió al esmalte de la desmineralización en un modelo de caries *in situ*. Sin embargo, esta protección es de manera parcial, según lo observado en los resultados de microdureza y densidad mineral. Además, demostró que la vía de administración tópica/sistémica es más efectiva en comparación a la administración tópica realizada por Colil el 2019 y la administración sistémica realizada por Azán el 2019, en donde ambos autores utilizaron el mismo modelo *in situ* de caries con la misma cepa probiótica que este estudio. No obstante, cabe señalar que aún no hay respaldo científico sobre otros estudios que hayan evaluado cual es la administración ideal de probióticos, como tampoco los mecanismos de acción de estas bacterias probióticas, la dosis, el vehículo, ni mucho menos la cepa probiótica óptima, por lo cual aún quedan muchas variables por estudiar para determinar el verdadero efecto de estas bacterias en el control de las condiciones microbiológicas de la cavidad oral y sobre la enfermedad de caries.



## IX. CONCLUSIONES

Al analizar los resultados, se observa que existen diferencias estadísticamente significativas en los promedios de microdureza superficial y densidad mineral de los bloques de esmalte entre el grupo expuesto al probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formato tópico/sistémico y sacarosa versus el grupo experimental expuesto solamente a sacarosa.

La morfología superficial del grupo experimental expuesto al probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formato tópico/sistémico presenta menos cantidad de poros y a la vez son menos marcados, con una superficie más regular en comparación al grupo expuesto solamente a sacarosa.

El probiótico *Lactobacillus rhamnosus* administrado en formato tópico/sistémico tiene un efecto benéfico/protector frente a los fenómenos de desmineralización de la caries dental.

## X. BIBLIOGRAFÍA

Aires CP, Tabchoury CP, Del Bel Cury A, Koo H, Cury JA. (2006) Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed in situ and on enamel demineralization. *Caries Res.* 40(1):28-32.

Akemi A, Ferruzzi F, Benetti AR, Suga RS, Fujimaki M, Correa R (2015). Susceptibility to Coffee Staining during Enamel Remineralization Following the In-Office Bleaching Technique: An In Situ Assessment. *J Esthet Restor Dent* 28: S23–S31

Albertí L; Más M; Martínez S; Méndez MJ (2007). Histogénesis del esmalte dentario. Consideraciones generales. *ACM vol.11 no.3 Camagüey*

Arezo Tahmourespour, Rooha Kasra-Kermanshahi, Rasool Salehi (2019). Lactobacillus rhamnosus biosurfactant inhibits biofilm formation and gene expression of caries-inducing Streptococcus mutans. *Dental Research Journal* 2019

Bajaj D., Arola D. (2009). On the R-curve behaviour of human tooth enamel. *Biomaterials.* 30:4037-4046

Barrington G, Khan S, Kent K, David S. Brennan, Leonard A. Crocombe and Silvana Bettiol (2019). Obesity, dietary sugar and dental caries in Australian adults. *International Dental Journal, Scientific Research Report*

British Society of Periodontology. (2016). Revised Basic Periodontal Exam Guidelines.

[[http://www.bsperio.org.uk/publications/downloads/94\\_154250\\_bpe2016-po-v5-final\\_002.pdf](http://www.bsperio.org.uk/publications/downloads/94_154250_bpe2016-po-v5-final_002.pdf)]

Cagetti G, Mastroberardino S, Milia E, Cocco F, Lingström P, Campus G (2013). The use of probiotic strains in caries prevention: a systematic review. *Nutrients* 5(7):2530-2550.

Creeth JE, Kelly SA, Gonzalez-Cabezas C, Karwal R, Martinez-Mier EA, Lynch RJM, Bosma ML, Zero D.T. (2016). Effect of toothbrushing duration and dentifrice quantity on enamel remineralisation: An in situ randomized clinical trial. *Journal of Dentistry*

Cury J.A , B. Rebello MA, Dei Bel Cury A. A.(1997). In situ Relationship between Sucrose Exposure and the Composition of Dental Plaque . *Caries Res* 31:356-360

Departamento Salud Bucal (2012). Diagnóstico nacional de salud bucal de los niños y niñas de 2 y 4 años que participan en la educación parvularia. Informe consolidado. Chile 2007-2010. Santiago, Chile: Ministerio de Salud

Encuesta Nacional de Salud (ENS) 2003. Primera entrega de resultados. Departamento de Epidemiología. División de Planificación Sanitaria. Subsecretaría de Salud Pública Ministerio de Salud. Santiago, 2003. MINSAL Chile. [Disponible en: <http://web.minsal.cl/portal/url/item/7dc33df0bb34ec58e04001011e011c36.pdf> (13/09/2017).

Encuesta Nacional de Salud (ENS) 2016-2017. Segunda entrega de resultados. Departamento de Epidemiología. División de Planificación Sanitaria. Subsecretaría de Salud Pública Ministerio de Salud. Santiago, enero 2018. MINSAL Chile. [Disponible en [https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2018/01/2-Resultados ENS\\_MINSAL\\_31\\_01\\_2018.pdf](https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2018/01/2-Resultados ENS_MINSAL_31_01_2018.pdf)

Ferreira R, Ricomini A, Tabchoury C, Campos G. Effect of high-fluoride dentifrice and bracket bonding composite material on enamel demineralization in situ. *Clinical Oral Investigations* (2020).

Featherstone JD, Mellberg JR. (1981). Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. *Caries Res.* 15(1):109–14.

Gómez ME, Campos A (1999). *Histología y Embriología Bucodental. Editorial Médica Panamericana S.A.*

H. Kashania, D. Birkheda, J. Arendsd, J Rubend, L.G. Peterssonc, H. Odeliusb (1998). Effect of Toothpicks with and without Fluoride on De- and Remineralization of Enamel and Dentine in situ. *Caries Res* 1998; 32:422–427

Hasslöf P, West CE, Videhult FK, Brandelius C, Stecksén-Blicks C. 2013. Early intervention with probiotic *Lactobacillus paracasei* F19 has no longterm effect on caries experience. *Caries Res.* 47(6):559–565

Hollanders, Kuper K, Maske T, Huysmans (2018). Secondary Caries in situ Models: A Systematic Review. *Caries Research*, 454–462

Jablonski A, Korbmacher H, Heinzl M, Jablonski B, Jaquet W, Bottenberg P (2020). Randomised in situ clinical trial investigating self-assembling peptide matrix P11-4 in the prevention of artificial caries lesions. *Scientific Reports*

Kalina A, Nassur C, Bezerra C, Salles L, Netto KR, Rezende A, Almeida A, Rosalen P, Gondim AM, Cople L (2018). Effect of TiF4 varnish on microbiological changes and caries prevention: in situ and in vivo models. *Clin Oral Investig.* 23(6): 2583–2591

Koll-Klais P, Mandar R, Leibur E, et al. Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: Species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:354–61.

Lodi S, Oliveira V, Brighenti I, Delbem C, Martinhon R (2015). Effects of probiotic fermented milk on biofilms, oral microbiota, and enamel. *Brazilian Oral Research*, 29(1): 01–01:29 (1): 01-01.

Lussi, Adrian & Jaeggi, T & Zero, Domenick. (2004). The Role of Diet in the Aetiology of Dental Erosion. *Caries research*. 38 Suppl 1. 34-44. 10.1159/000074360.

María Paz Colil Orellana (2019). EFECTO DEL USO TÓPICO DEL PROBIÓTICO LACTOBACILLUS RHAMNOSUS SP1 EN UN MODELO DE CARIES IN SITU. Tesis para optar al título de Cirujano Dentista. Universidad de Chile, Santiago, Chile

Maria Seminario-Amez, Jose López-López, Albert Estrugo-Devesa, Raul Ayuso-Montero, Enric Jané-Salas (2017). Probiotics and oral health: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2017 May 1;22 (3):e282-8

Mandava, J (2017). Microhardness and Penetration of Artificial White Spot Lesions Treated with Resin or Colloidal Silica Infiltration. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*.

Maritza de la Caridad Sosa Rosales (2003). *EVOLUCIÓN DE LA FLUORURACIÓN COMO MEDIDA PARA PREVENIR LA CARIES DENTAL*. *Rev Cubana Salud Pública* 2003;29(3):268-74

Mark L Cannon, Ashlee Vorachek , Catherine Le , Kevin White (2019). Retrospective Review of Oral Probiotic Therapy. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry* Volumen 43, Number 6/2019

Marró Freitte ML, Candiales de Castillo YM, Cabello Ibacache R, Urzúa Araya I, Rodríguez Martínez G (2013). Aspectos sobre la medición del impacto de la caries dental en la calidad de vida de las personas: Artículo de revisión. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral* Vol. 6(1); 42-46.

Matsuyama Y., G. Tsakos, S. Listl, J. Aida, and R.G. Watt (2019). Impact of Dental Diseases on Quality-Adjusted Life Expectancy in US Adults. *Journal of Dental Research* (1-7)

Melchora FC, Guadalupe LR, Battellino LJ (2007). PELÍCULA ADQUIRIDA SALIVAL: REVISIÓN DE LA LITERATURA. *Acta Odontol. Venez. Vol. 45; 1-11*

Melo, M.A.S.; Weir, M.D.; Passos, V.F.; Rolim, J.P.M.; Lynch, C.D.; Rodrigues, L.K.A.; Xu, H.H.K. (2018) Human In Situ Study of the effect of Bis(2-Methacryloyloxyethyl) Dimethylammonium Bromide Immobilized in Dental Composite on Controlling Mature Cariogenic Biofilm. *Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 3443.*

Mellberg JR, Loertscher KL. (1974). Comparison of in vitro fluoride uptake by human and bovine enamel from acidulated phosphate-fluoride solutions. *J Dent Res. 53(1):64-7.*

Mendoza C (2007). El dilema ético de la fluoración del agua potable. *Rev Méd Chile; 135: 1487-1493*

Mettu S, Srinivas N, Reddy Sampath CH, Srinivas N (2015). Effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (cpp-acp) on caries-like lesions in terms of time and nano-hardness: An in vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent;33:269-73.*

Näse L, Hatakka K, Savilahti E, et al (2001). 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):412-40.*

Nicolás Azán Peralta (2019). Efecto del consumo de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en la densidad mineral, dureza superficial y morfología superficial de esmalte en un modelo in situ de caries. Tesis para optar al título de Cirujano Dentista. Universidad de Chile, Santiago, Chile

Núñez DP, García L (2010). Bioquímica de la caries dental. *Revista Habanera*

N.P.T. Innes, C.H. Chu, M. Fontana, E.C.M. Lo, W.M. Thomson, S. Uribe, M. Heiland, S. Jepsen, and F. Schwendicke (2019). A Century of Change towards Prevention and Minimal Intervention in Cariology. *Journal of Dental Research*, Vol. 98(6) 611–617

OMS (2006). Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Estudio fao alimentación y nutrición 85 : 5

O. Fejerskov (2004). Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries: Consequences for Oral Health Care. *Caries Res* 2004; 38:182–191

Pamela Hasslöf y Christina Stecksén-Blicks (2020). Chapter 10: Probiotic Bacteria and Dental Caries. Monogr Oral Sci. Basel, Karger, 2020, vol 28, pp 99–107

Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, Tagami J, Twetman S, Tsakos G and Ismail A (2017). Dental Caries. *Nature review, disease primers*, vol. 3, article number 17030

Phantumvanit P, Makino Y, Ogawa H, Rugg-Gunn A, Moynihan P, Petersen PE, Evans W, Feldens CA, Lo E, Khoshnevisan M, Baez R, Varenne B, Vichayanrat T, Songpaisan Y, Woodward M, Nakornchai S, Ungchusak C (2017). WHO Global Consultation on Public Health Intervention against Early Childhood Caries. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2018;1–8.

P. Lingstrom, D. Birkhed, J. Ruben', and J. Arends' (1994). Effect of Frequent Consumption of Starchy Food Items on Enamel and Dentin Demineralization and on Plaque pH in situ. *J Dent Res* 73(3): 652-660

R.J. Wierichsa , J. Musiolc, D. Erdweyd, M. Esteves-Oliveirac,e, C. Apelb ,H. Meyer-Lueckela (2020). Re- and demineralization characteristics of dentin

depending on fluoride application and baseline characteristics in situ. *Journal of Dentistry*

Rivera CA, Ossa A., Arola D (2012). Fragilidad y comportamiento mecánico del esmalte dental. *Revista Ingeniería Biomédica ISSN 1909-9762*. 6(12): 10-16.

Rodríguez G. et al. (2016 a,b) . Probiotic Compared with Standard Milk for Highcaries Children: A Cluster Randomized Trial . *Journal of Dental Research* 1–6

Sampaio de Melo M.A , Passos V. , Marques Lima P. , Lima Santiago , Lidiany Karla Azevedo Rodriguez (2016) Carbohydrate-electrolyte drinks exhibit risks for human enamel surface loss . ISSN 2234-7658 (print) / ISSN 2234-7666 (online)

Seminario-Amez M, Lopez-Lopez J, Estrugo-Devesa A, Ayuso-Montero R, JaneSalas E (2017). Probiotics and oral health: A systematic review. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, 0–0

Shahmoradi M, Hunter N, Swain M (2017). Efficacy of Fluoride Varnishes with Added Calcium Phosphate in Protection of the Structural and Mechanical Properties of enamel. *Biomed Res Int* 2017:7834905

Singh, R.P.; Damle, S.G.; Chawla, A. (2011) . 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.*, 69, 389–394

Stecksén-Blicks C, Sjöström I, Twetman S. 2009. Effect of long-term consumption of milk supplemented with probiotic lactobacilli and fluoride on dental caries and general health in pre-school children: a cluster-randomized study. *Caries Res*. 43(5):374– 381.

Subramaniam P, Telegeti S (2017). Effect of different concentrations of fluoride varnish on enamel surface microhardness: An *in vitro* randomized controlled



study. *Journal of Indian Association of Public Health Dentistry Vol. 14, Issue 3*

Sung Y, Kim H, Son H, Chang J (2014). How to design in situ studies: an evaluation of experimental protocols. Aug; 39(3): 164–171

Taipale, T.; Pienihäkkinen, K.; Salminen, S.; Jokela, J.; Söderling, E. (2012). Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 administration in early childhood: A randomized clinical trial of effects on oral colonization by mutans streptococci and the probiotic. *Caries Res.*, 46, 69–77.

Tahmourespour A, Kasra-Kermanshahi R, Salehi R (2019). Lactobacillus rhamnosus biosurfactant inhibits biofilm formation and gene expression of caries-inducing Streptococcus mutans. *Dent Res J* 2019;16:87-94.

Twetman, Svante; Jørgensen, Mette Rose; Keller, Mette Kirstine (2017). Fifteen Years of Probiotic Therapy in the Dental Context, What Has Been Achieved?. *Journal of the California Dental Association*

White S.N., Luo W., Paine M-L-, Fong H., Sarikaya M., M.L (2001). Snead Biological Organization of Hydroxyapatite Crystallites into a Fibrous Continuum Toughness and controls anisotropy in Human Enamel. *J. Dent Res* 80, 1, 321-326

World Health Organization (WHO). (1997). Encuestas de Salud Bucodental: Métodos básicos. 4ed. Ginebra

Zero DT. (1995). In situ caries models. *Adv Dent Res*; 9:214-230.

Zero, D. T. (1999) Dental caries process. *Dent. Clin. North Am.* 43, 635–664

## XI. ANEXO 1: Acta de aprobación proyecto de investigación



INFORME N°:2016/30

Acta de Aprobación de Proyecto FIOUCH titulado "Efecto del consumo de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formatos sistémico y tópico en la morfología, diversidad y composición del biofilm bucal. Modelo *in situ* de caries." Versión 11/2016.

1. Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:

Dr. Eduardo Fernández  
Presidente CEC

Dr. Marco Cornejo  
Vicepresidente CEC

Dra. Weronika Weil  
Miembro Permanente CEC

Sra. Paulina Navarrete  
Miembro Permanente CEC

Sr. Roberto La Rosa  
Miembro Permanente CEC

Dr. Rodrigo Cabello  
Miembro Permanente CEC

Dr. Alfredo Molina  
Miembro Permanente CEC

Dra. Paola Llanos  
Miembro Permanente CEC

Dr. Juan Estay  
Miembro Permanente CEC

Sra. Rebeca Galarce  
Representante de la Comunidad

Dra. Viviana Toro  
Miembro Alterno CEC

Fe-24 Agosto 2017

**2. Fecha de Aprobación: 03/05/2017**

**Título completo del proyecto:** "Efecto del consumo de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formatos sistémico y tópico en la morfología, diversidad y composición del biofilm bucal. Modelo *in situ* de caries." Versión 11/2016.

**3. Investigador responsable: Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez****4. Institución Patrocinante: Facultad de Odontología – Universidad de Chile****5. Documentación Revisada:**

- Proyecto
- Consentimiento Informado (CI)
- Carta de presentación o solicitud de revisión/evaluación.
- Carta de Intención de la Investigador
- Carta de Compromiso de la Investigador
- Carta de Autorización del Uso de Sillón
- Carta del Director de Departamento de Odontología Restauradora

**6. Fundamentación de la aprobación**

Este proyecto es aprobado luego que se realizaran las modificaciones en relación a los siguientes aspectos:

**RESPECTO A ASPECTOS METODOLÓGICOS:**

- En el formulario de consentimiento informado, en la sección objetivo de la investigación, adaptarlo al formato sugerido por el CEC, publicado en la página web. Incluyendo nombres del IP e institución patrocinante.

**RESPECTO A ASPECTOS JURIDICOS:**

- Enviar una declaración de conflicto de intereses.
- Declarar explícitamente que este proyecto no se aplicará en poblaciones vulnerables sujetas a tutorías o evaluaciones directas como los son alumnos de FOUCH.

E-04 Agosto 2017

**RESPECTO A ASPECTOS ÉTICOS:**

Realizar las siguientes modificaciones al C.I.:

- > Modificaciones en su lenguaje, especialmente en las secciones de "Procedimiento", que faciliten la comprensión por parte de los sujetos voluntarios. Se requiere incluir a los demás coinvestigadores que pudieran tomar el consentimiento informado.
- > Incluir los criterios de exclusión e inclusión dentro del CI.
- > Explicar la obtención de los bloques de dientes humanos utilizados en las placas en esta investigación. Presentar documentación que avale la obtención.

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, ha aprobado el Protocolo del estudio titulado "Efecto del consumo de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formatos sistémico y tópico en la morfología, diversidad y composición del biofilm bucal. Modelo *in situ* de caries." Versión 11/2016.



Dr. Eduardo Fernández O.  
Presidente CEC



c/c.: Investigador Principal y Secretaria C.E.C.

## XII. ANEXO 2: Consentimiento informado



Edición del CI 25/08/2017

### Consentimiento Informado Para Participación en Proyecto de Investigación Dirigido a Adultos

**Título del Protocolo:** Efecto del consumo de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formatos sistémico y tópico en la morfología, diversidad y composición del biofilm bucal. Modelo *in situ* de canes

**Investigador Principal:** Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez

**Sede de Estudio:** Facultad de Odontología, Universidad de Chile – Sergio Livingstone 943 – Independencia, Santiago,

**Nombre del Participante:**

.....



Este documento de Consentimiento Informado se aplicará a Adultos y consta de dos partes:

- Información (proporciona información sobre el estudio para usted).
  - Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar).
- Ud. recibirá una copia completa del Documento de Consentimiento Informado.

Este Proyecto está conformado por un equipo investigador y académico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Como Investigador Principal esta Gonzalo Rodríguez Martínez y como Co investigadores, Patricia Palma y Begoña Moreno. Estamos realizando una investigación cuyo objetivo es determinar el efecto que el consumo de probióticos en la composición de la placa dental dependiendo si se toman o se aplican directamente en los dientes. Para ello, se invitarán a participar voluntarios de entre 18 y 30 años de edad.

Le proporcionaremos información y lo invitamos a ser parte de este proyecto. No tiene que decidir hoy si lo hará o no. Antes de tomar su decisión puede hablar acerca de la investigación con cualquier persona de su confianza. Este proceso se conoce como Consentimiento Informado y puede que contenga términos que usted no comprenda, por lo que siéntase con la absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude aclarar sus dudas al respecto. Una vez aclarada todas sus consultas y después que haya comprendido los objetivos de la investigación y si usted desea participar, se le solicitará que firme este formulario.



Edición del CI 25/09/2017

**Justificación de la investigación**

La caries dental es una enfermedad crónica, multifactorial y de alta prevalencia a nivel mundial. El tratamiento convencional de la caries dental ha sido históricamente la remoción quirúrgica del tejido afectado por caries, sin embargo se ha demostrado que el enfoque restaurador basado en la operatoria clásica por sí solo, no logra controlar la enfermedad. Existen diversas estrategias preventivas para el manejo de la caries dental, entre las que se describen algunos mecanismos para modificar la biopelícula o placa dental. Dentro de este último grupo se encuentran los probióticos, que han sido históricamente utilizados en el tratamiento y prevención de una amplia gama de condiciones y patologías del ser humano. Estudios clínicos avalan el uso de probióticos como agentes beneficiosos sobre la salud oral, y en particular un estudio clínico llevado a cabo por nuestro grupo de investigación, demuestra su efecto en la disminución de la incidencia de lesiones de caries en párvulos, sin tener claro cuál es el mecanismo de acción que tiene estas bacterias probióticas.

**Objetivo de la investigación**

La presente investigación tiene por objetivo determinar el efecto que el consumo de probióticos en la composición de la placa dental dependiendo si se toman o se aplican directamente en los dientes. Para ello, se invitarán a participar voluntarios de entre 18 y 30 años de edad.

**Beneficio de la investigación.**

Usted podrá conocer su estado de salud oral y aportará con información relevante sobre el efecto de los probióticos en salud oral.

**Tipo de intervención y Procedimiento.**

Si usted decide participar será examinado para evaluar su situación de salud oral y luego se le invitará a utilizar una placa acrílica en el paladar. Las placas contendrán bloques de dientes humanos estériles. Se le solicitará aplicar azúcar en gotas con un gotero que se le entregará sobre los bloques de diente 5 veces al día y en 2, 3 o 4 de ellas.

Dependiendo del grupo al que haya sido asignado, se le solicitará hacer 1 de las siguientes acciones:

- Ingerir 100 ml de agua en la que se ha suspendido una dosis liofilizada de probiótico. Esta acción se realiza con el aparato fuera de la boca.
- Aplicar 5 gotas de 100 ml de agua en la que se ha suspendido una dosis liofilizada de probiótico. Esta acción se realiza sobre los bloques de esmalte en el aparato removible.
- Ingerir 100 ml de agua en la que se ha suspendido una dosis liofilizada de probiótico. Esta acción se realiza con el aparato dentro de la boca.

Aparte de cada vez que se aplique el probiótico ya sea tópico o sistémico, las placas solo se removerán para comer y para lavarse los dientes. Las placas serán utilizadas 14 días cada una. El probiótico utilizado es un lactobacilo con probadas propiedades benéficas para el organismo humano.

Al cabo de cada fase experimental, las placas serán devueltas a los investigadores los que analizarán las bacterias formadas y la desmineralización provocada.

**Riesgo de la investigación.**

Usted no correrá ningún riesgo mediante y posterior al procedimiento de la investigación debido a que este protocolo es mínimamente invasivo, la utilización del aparato es inocuo para su salud y la toma de muestras no produce ningún daño. Además, su participación en este estudio no tiene ningún costo económico para usted. En caso de presentar algún tipo de molestia o incomodidad póngase en contacto con los investigadores de este proyecto.

**Criterios para selección de los participantes en el estudio**

Los criterios de inclusión serán: individuos de ambos sexos, de entre 18 y 30 años de edad, sin enfermedades sistémicas, no fumadores, libres de gingivitis y enfermedad periodontal, con al menos 20 dientes naturales y sin lesiones de caries cavitadas.

Edición del CI 25/09/2017

Los criterios de exclusión serán: individuos que estén o hayan estado con tratamiento antibiótico o antiséptico los últimos 6 meses previos a participar del estudio e individuos que presenten alteraciones del flujo salival.

**Confidencialidad y difusión de datos.**

La información obtenida de la investigación, respecto de la identificación de participantes, será mantenida con estricta confidencialidad por el investigador. El nombre y datos personales de usted serán codificados para el uso en este estudio y no serán identificados públicamente. Los resultados emanados de este estudio podrán ser publicados en revistas científicas.

**Aclaraciones**

- La participación es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la intervención y/o participación.
- Si usted decide puede retirarse cuando lo desee.
- No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- Usted podrá solicitar información actualizada sobre el estudio, al investigador responsable.
- La información obtenida de la investigación, respecto de la identificación de participantes será mantenida con estricta confidencialidad por los investigadores.
- Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de su participación, puede si lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado anexa al documento.

### XIII. ANEXO 3: Ficha Clínica



Evaluación de voluntarios para participación en trabajo de investigación titulado “Efecto del uso tópico/sistémico del probiótico *Lactobacillus rhamnosus SP1* en la densidad mineral, dureza superficial y morfología superficial de esmalte en un modelo de caries *in situ*.”

Nombre				Rut	
Fecha de Nacimiento		Edad		Teléfono	

Posibilidad de utilizar dispositivo durante periodo experimental: (1) Si (2) No

#### Anamnesis

1. Antecedentes mórbidos:
2. Antecedentes quirúrgicos (Fecha, diagnóstico, procedimiento, complicaciones):
3. Alergias:
4. Medicamentos (Nombre, dosis, fecha inicio):
5. Hábitos
  - Tabaco:
  - Alcohol:
  - Drogas:
  - Controles odontológicos (frecuencia, fecha último control y causa)
6. Alimentación:
  - Frecuencia:
  - Ocasión:
  - N° ingestas HC:
  - Calidad:
  - Consistencia:
  - Valor potencial cariogénico:
7. Higiene Oral

- Frecuencia cepillado:
- Ocasión:
- Tipo de cepillo, pasta, enjuague:

8. Antecedentes Familiares:

### **Examen Físico**

1. Examen Físico General:

2. Examen Intraoral:

Alteraciones Salivales: (1) Si (2) No

Portador de prótesis removible u ortodoncia: (1) Si (2) No

3. Examen Periodontal Básico


4. COPD

- C:
- O:
- P:
- D:



## XIV. ANEXO 4: Donación de terceros molares



### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE DIENTES PARA EL ESTUDIO DE MECANISMO DE ACCIÓN DE PROBIÓTICOS

**Título del Protocolo:** "Efecto del consumo de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formatos sistémico y tópico en la morfología, diversidad y composición del biotín bucal. Modelo *in situ* de caries"

**Investigador Principal:** Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez

**Sede de Estudio:** Facultad de Odontología, Universidad de Chile – Sergio Livingstone 543 – Independencia, Santiago.

**Nombre del Donante** .....

Este documento de Consentimiento Informado se aplicará a pacientes con indicación de extracción de terceros molares, y consta de dos partes:

- Información (proporciona información sobre el estudio para usted).
  - Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar).
- Ud. recibirá una copia completa del Documento de Consentimiento Informado.

Mi nombre es Gonzalo Rodríguez Martínez y soy académico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Estoy realizando una investigación de la cual le proporcionaré información y a la que lo invitaré a participar. No tiene que decidir hoy si lo hará o no. Antes de tomar su decisión puede hablar acerca de la investigación con cualquier persona de su confianza. Este proceso se conoce como Consentimiento Informado y puede que contenga términos que usted no comprenda, por lo que siéntase con la absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a clarificar sus dudas al respecto.

Una vez aclarada todas sus consultas y después que haya comprendido los objetivos de la investigación y si desea participar, se le solicitará que firme este formulario.

#### Justificación de la Investigación

Existe evidencia que el consumo de probióticos es útil en la prevención de caries dental, pero se desconoce su mecanismo de acción.

#### Objetivo

El objetivo del estudio es determinar el efecto que el consumo de probióticos en la composición de la placa dental dependiendo si se toman o se aplican directamente en los dientes. Para ello se montarán en un dispositivo artificial trozos de dientes humanos estériles.

#### Beneficios

No existe ningún tipo beneficio inmediato por la participación en el estudio ya que los dientes a utilizar son normalmente desechados. Sin embargo, como consecuencia de esta donación y de la investigación a realizar se espera contribuir a aplicaciones futuras en el ámbito de la odontología.

#### Tipo de Intervención y Procedimiento

Si usted decide participar los dientes que le serán extraídos serán almacenados para ser posteriormente utilizados en el presente estudio.

#### Riesgos

Los dientes donados se utilizarán sólo con el fin expuesto y no se guardará ningún registro de su relación con usted como donante. Ningún otro tipo de estudio se realizará con los dientes. Una vez observados y descritos, los dientes serán destruidos y eliminados siguiendo los protocolos de bioseguridad.

La donación en sí no presenta riesgos, ni costos adicionales para usted, y el financiamiento del proceso quirúrgico de extracción será su responsabilidad.

#### Criterios para selección de los participantes en el estudio

Los criterios de inclusión serán: pacientes con indicación de extracción de terceros molares, cuyos terceros molares estén incluidos.

**Confidencialidad y difusión de datos.**

La información obtenida de la investigación, respecto de la identificación de participantes, será mantenida con estricta confidencialidad por el investigador. El nombre y datos personales de usted serán codificados para el uso en este estudio y no serán identificados públicamente. Los resultados emanados de este estudio podrán ser publicados en revistas científicas.

**Aclaraciones**

- La donación de los dientes es completamente voluntaria
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted en caso de no aceptar la invitación.
- No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.
- No recibirá pago por su donación.
- Usted podrá solicitar información actualizada sobre el estudio, al Investigador responsable.
- La información obtenida de la investigación, respecto de la identificación de pacientes, será mantenida con estricta confidencialidad por los investigadores.
- Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado anexa al documento.

**Carta de Consentimiento Informado**

A través de la presente, declaro y manifiesto, libre y espontáneamente y en consecuencia acepto que:

1. He leído y comprendido la información anteriormente entregada y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria.
2. Tengo conocimiento del procedimiento a realizar.
3. Conozco los beneficios de participar en la investigación.
4. El procedimiento no tiene riesgo alguno para mi salud.
5. Además de esta información que he recibido, seré informado(a) en cada momento y al requerimiento de la evolución de mi proceso, de manera verbal y/o escrita si fuera necesaria y al criterio del investigador.
6. En caso de cualquier duda puede acudir a Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez, Sergio Livingstone 943 los días lunes y miércoles de 8:00 – 17:00 o vía telefónica al 29761742 o también se puede dirigir al representante del Comité Ético de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile: Prof. Dr. Eduardo Fernández, al teléfono 229761742, en horario de oficina o al mail [cec.fouchn@odontologia.uchile.cl](mailto:cec.fouchn@odontologia.uchile.cl)

Doy mi consentimiento al investigador y al resto de colaboradores, a realizar el procedimiento pertinente, PUESTO QUE SE QUE ES POR MI PROPIO INTERÉS.

Nombre del participante	Firma	Fecha
-------------------------	-------	-------

**Sección a llenar por el Investigador Principal**

He explicado al Sr(a) \_\_\_\_\_ la naturaleza de la investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que conozco la normativa vigente para la realizar la investigación con seres humanos y me apego a ella.

Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez (Investigador Principal)

Nombre de Ciudad de establecimiento donde se realiza la investigación o de su representante	Firma	Fecha
---	-------	-------

## XV. ANEXO 5: Protocolo de intervención probiótico tópico/sistémico



### PROTOCOLO DE INTERVENCIÓN PROBIÓTICO TÓPICO/SISTÉMICO

Estimado Participante, bienvenido al estudio titulado “Efecto del probiótico *Lactobacillus rhamnosus SP1* en un modelo de caries *in situ*”. Agradecemos profundamente su generosa disposición para ser parte de este proyecto de investigación. A continuación, explicaremos paso a paso las maniobras que deberá realizar durante el periodo de experimentación.

Al comienzo del periodo, se le entregará de parte del equipo investigador un bolso que contiene los siguientes elementos:

- Dispositivo intraoral: esta es una estructura acrílica removible que tiene incorporadas por muestras dentarias: 1 muestra en la zona palatina, 2 muestras en la zona vestibular derecha y 2 muestras en la zona vestibular izquierda. El siguiente esquema representa la posición de las muestras en el dispositivo:



- 14 sobres de probiótico • 2 frascos pequeños (30 ml) con sacarosa • 1 frasco grande (150 ml) para probiótico • Recipiente para guardar el dispositivo

Al comienzo del periodo de experimentación, el cual le será indicado por el equipo

de investigadores, Ud. deberá utilizar el dispositivo intraoral durante un periodo continuo de 14 días, 24 horas al día. SÓLO podrá remover el dispositivo desde el interior de la boca para higienizarse los dientes (cepillado), beber líquidos o comer. Esto significa que deberá dormir con el dispositivo por el tiempo que dure el estudio.

Al remover el dispositivo almacenarlo en recipiente que se le entregará para ello, envuelto en 1 cuadrado de toalla nova de 20x20 cm humedecida en agua.

Remover el dispositivo máximo 4 veces al día, 30 min cada vez.

Se recomienda lavarse los dientes al menos dos veces al día, por dos minutos y con pasta fluorada. Por otro lado, durante el periodo de experimentación, se debe evitar el uso de los siguientes elementos:

- Enjuague bucal
- Antiácidos
- Medicamentos (por ejemplo: antibióticos o antisépticos)
- Consumo de alcohol
- Prohibido fumar cigarrillos y/o consumir drogas

En caso de necesitar utilizar alguno de los elementos descritos, debe comunicarse inmediatamente con el equipo de investigadores para determinar la conducta a seguir.

TODOS LOS ELEMENTOS ENTREGADOS PARA EL ESTUDIO SE DEBEN GUARDAR EN EL BOLSO ORIGINAL y al finalizar el estudio se deben entregar de la misma forma al equipo investigador.

Modo de Aplicación de las Soluciones:

Paso 0: DURANTE LOS 2 PRIMEROS DÍAS. Al levantarse por la mañana debe realizar la primera aplicación de sacarosa que se encuentra contenida en el frasco pequeño: una vez retirado el dispositivo de la boca, DEBE APLICAR 1 GOTA DE SACAROSA EN CADA UNA DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO. Inmediatamente

luego de aplicar la gota de sacarosa, debe volver a colocar el dispositivo dentro de la boca. Aplicar sacarosa cada 2 horas, 8 veces al día.

DESDE EL TERCER DÍA EN ADELANTE CONTINUAR CON PASO 1  
Paso 1: Al levantarse por la mañana debe preparar la dosis de probiótico: tome 1 de los sobres, el cual contiene una porción de probióticos liofilizados y mézclela con 150 ml de agua potable en el frasco grande que se le ha entregado. Agite bien y conserve. DEBE GUARDAR ESTA PREPARACIÓN EN EL BOLSO PUES DEBERÁ INGERIRLA 2 HORAS DESPUÉS DE HABERLA REALIZADO.

Paso 2: Inmediatamente después de preparar el probiótico, debe realizar la primera aplicación de sacarosa que se encuentra contenida en el frasco pequeño: una vez retirado el dispositivo de la boca, DEBE APLICAR 1 GOTA DE SACAROSA EN CADA UNA DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO. Inmediatamente luego de aplicar la gota de sacarosa, debe volver a colocar el dispositivo dentro de la boca.

Paso 3: 2 horas después de la primera aplicación de sacarosa, SIN RETIRAR el dispositivo de la boca, proceder a INGERIR LA PREPARACIÓN REALIZADA AL COMIENZO DEL DÍA EN EL FRASCO PARA PROBIÓTICO (frasco grande).

Paso 4: Luego de la ingestión del probiótico en el paso 3, enjuagar vigorosamente la boca con agua y aplicar inmediatamente 1 gota de sacarosa en todas las muestras. Luego de aplicar la gota de sacarosa, debe volver a colocar el dispositivo dentro de la boca.

Paso 5: Debe continuar aplicando 1 gota de sacarosa en todas las muestras con el dispositivo fuera de la boca, durante todo el día y CADA 2 HORAS, hasta completar un total de 8 APLICACIONES de sacarosa durante todo el día. Una vez aplicada la gota de sacarosa, debe volver a colocarse el dispositivo en el interior de la boca.



## XVII. ANEXO 7: Evaluación de cumplimiento final



Estimado participante, Mediante el siguiente cuestionario evaluaremos el periodo experimental al que fue sometido. Se solicita responder a conciencia y con la mayor honestidad posible las siguientes preguntas. El cuestionario es anónimo.

1. Cumplió con todas las aplicaciones: Si \_\_\_ No\_\_\_
2. Si su respuesta es no ¿cuántas aplicaciones no realizó? :
3. Las aplicaciones de sacarosa fueron cada 2 horas: Si \_\_\_ No\_\_\_
4. Evalúe en la siguiente escala su cumplimiento, marque con una x el número de la escala que siente que más lo representa.

Escala	Significado	
1	No cumplí con ninguna de las aplicaciones ni horarios	
2	Omití más de 5 aplicaciones durante el periodo experimental	
3	Omití 2 a 5 aplicaciones durante el periodo experimental	
4	Omití 1 aplicación durante el periodo experimental	
5	Cumplí con todas las aplicaciones con diferencias en los horarios de aplicación de 30 min a 1 hora	
6	Cumplí con todas las aplicaciones con diferencias en los horarios de aplicación de 15 min a 20 min	
7	Cumplí con todas las aplicaciones en los horarios establecidos	

5. Marque con una x las siguientes frases si representaron su experiencia

	Si	No
Retiré el dispositivo para alimentarme y lavarme los dientes		
Dormí con el dispositivo		
Omití algún día del periodo experimental		
Use el dispositivo según las instrucciones día y noche		

6. En el siguiente espacio anote, con letra clara, observaciones y/o dificultades que tuvo durante el periodo experimental.

---

---

---

---

---

---

---

---