



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

“EFECTO DEL USO DEL PROBIÓTICO *Lactobacillus rhamnosus* GG EN LA MICRODUREZA SUPERFICIAL DEL ESMALTE EN UN MODELO *IN VITRO* DE CARIES.”

Felipe Hernán Morales Valerio

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Rafael Ignacio Contador Cotroneo

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez

Prof. Dra. Patricia Palma Fluxá

**Adscrito a Proyecto FonDOR 2022/02
Santiago - Chile
2023**



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

“EFECTO DEL USO DEL PROBIÓTICO *Lactobacillus rhamnosus* GG EN LA MICRODUREZA SUPERFICIAL DEL ESMALTE EN UN MODELO *IN VITRO* DE CARIES.”

Felipe Hernán Morales Valerio

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Rafael Ignacio Contador Cotroneo

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez

Prof. Dra. Patricia Palma Fluxá

**Adscrito a Proyecto FonDOR 2022/02
Santiago - Chile
2023**

Dedicada a:

Jéssica, Hernán, Fernanda, Martín, Paula y Natalia.

Luka, Julieta, Pancho

y a mis dinosaurios, que más temprano que tarde nos vamos a extinguir.

“Los sueños de un hombre jamás mueren” – Eiichiro Oda

“Todo lo que un hombre pueda imaginar es una posibilidad en la vida real” – Eiichiro Oda

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo agradecer a mi mamá Jessica Valerio, a quien debo todo lo que soy hoy, con sus interminables sacrificios por mí y mis hermanos hasta este día; a mi papá Hernán Morales, quien, aunque se haya ido demasiado pronto, me dejó grandes cosas que espero nunca perder. También agradecer a mis hermanas, Fernanda y Paula, y mi hermano Martín, quienes incluso sin saberlo fueron sólidos pilares en algunos de mis tiempos más oscuros. Y a esos hermanitos peludos que la vida puso en mi camino, Luki, Juli y Pancho, quienes sin saberlo más de una vez fueron apoyo en momentos difíciles. Hoy en día no dudo en decir que este tan añorado logro es tan mío como de ustedes.

A Natalia, compañera de vida y de aventuras estos últimos 5 años, gracias por tu amor y aguante incondicional, siendo apoyo y pilar fundamental en mis momentos más difíciles, no hay palabras ni conceptos para definir la deuda que tengo contigo y espero durante mi vida poder estar a la altura para retribuirte lo mucho que tú has hecho por mí; fuiste, por lejos, la mejor compañera que pude desear para cerrar este proceso. También a sus padres, Myriam y Jorge, quienes me (nos) han apoyado en este largo proceso.

A los TTVV FECH y toda su gente, por volverme una mejor persona, enseñarme la importancia del trabajo en equipo y mostrarme una realidad que ignoraba. A los miembros del CEO 2015, 2017 y 2018, por confiar en mi como yo confié en ustedes, a todos y cada uno los llevo de alguna forma conmigo.

Agradecimientos a mis amigos de la vida no odontológica. A mi amigo Gonzalo quien desde el primer momento creyó en mí, y me apoyó incluso cuando la distancia y la vida nos fue separando. A Luis, quien en más de una ocasión estuvo ahí para prestar una mano y, más importante aún, una sonrisa. A Salem y su eterna disposición a escuchar, comprensivo y sin juzgar. A Marcela, que la vida puso en mi camino y quien incondicionalmente se ha mantenido ahí, aun después de todos estos años, viviendo cada logro individual como si fuera de ambos.

A Antonia, quien nos entregó en tantas ocasiones un lugar seguro, un tecito, un café y horas de conversación, contención y un cariño infinito; aunque la vida nos distancie, imposible olvidarme de que es mejor ser bueno que rico.

Para mis amigos odontológicos, de esos que pueden entender lo que significa este muchas veces largo proceso de carrera; tanto aquellos que pasaron como aquellos que se quedaron, muchas gracias. A Isabella, quien fuera gran compañía en esos momentos de 2020 donde no había compañía, a Barby, Yudi, Aníbal, George y Nico, a quienes conocí por casualidad y hoy son grandes amigos.

A mis dinosaurios, mi familia de la universidad, quienes nos encontramos y de a poco nos fuimos uniendo en base al cariño Miru, Jose, Vica, Fran, Tannia, Panchi, Javi y Gabito, los quiero un montón mis saurios.

Agradecer desde el fondo de mi ser a Ceci, compañera de momentos que marcaron mi paso por esta universidad, incondicional y presente aun cuando más de 10.000 km de distancia nos separaban. A Maurizio Emanuelli, quien, con defectos y virtudes, siempre ha hecho lo imposible para que crezcamos y salgamos adelante juntos, creyendo en mí y dándome esa confianza de la que en muchas ocasiones carecía, demostrando que los humanos si nos hacemos mejores cuando vamos todos en equipo. A Constanza Avilés, chica querida siempre dispuesta a mover montañas por el resto, fuerte y admirable, con mucho material de líder.

A aquellas profesoras que me marcaron para bien en mi paso por esta escuela: Claudia Lefimil, Mónica Ricart y Silvana Maggiolo.

A la gente de la UTE de Adulto Mayor de 5° año 2022, quienes me ayudaron a reencantarme con la odontología. Sobre todo, a mis amigos Víctor, Guille, Sigrid y especialmente a Ismael, compañero de colegio, universidad, juegos, y conversaciones, muchas de ellas no tan relevantes, pero igual de enriquecedoras.

Al equipo de volleyball de la facultad, donde encontré refugio, risas y amigos que me ayudaron a sobrellevar los malos momentos, especialmente a Tere, quien siempre tuvo una paciencia de oro para enseñarnos y comprendernos, con esas

condiciones tan especiales de esta carrera que muchas veces vuelven imposible concentrarse en otra cosa que no sea académica.

Quiero agradecer también al equipo del LabMIO: a Dany por su inigualable ayuda, Carly, Carmen, Joaquín y Chelo, quienes nos ayudaron con guiarnos y facilitarnos material y tiempo durante nuestro breve paso por el laboratorio. Agradecer también mis compañeros de equipo de laboratorio, Fran, George y Nati; también a Daniela Tobar por ayudarnos con aquellos procedimientos de los que no entendíamos mucho.

También quiero agradecer a mis tutores. Al Dr. Gonzalo Rodríguez por creer en mí, por apoyarme y por sus palabras de aliento no sólo durante el desarrollo de este proyecto de tesis, sino también durante varias partes de la carrera. A la Dra. Patricia Palma por guiarnos en el procedimiento experimental, por ayudarnos a comprender y por exponernos su lado humano, lo que vale mucho más. Al Dr. Rafael Contador, quien desde mi primer año de universidad ha estado presente, como compañero de cursos mayores, como presidente del CEO, como docente o simplemente con un consejo o un mensaje de apoyo y a quien, hoy me enorgullezco de presentar como mi tutor de proyecto de tesis y espero estar a la altura de aquello que él espera de mí.

Finalmente, agradecer a esos compañeros que representaron un refugio en mi camino, porque cuando no quería saber de nada ni nadie, fueron ellos los que me enseñaron a gritar a los cuatro vientos “Quiero vivir” mientras el mundo se me caía a pedazos. Muchísimas gracias Nakamas 🏴‍☠️.

CONTENIDO

1. RESUMEN	
2. INTRODUCCIÓN	1
3. MARCO TEÓRICO.....	2
3.1 Caries dental.....	2
3.2 Caries dental según un enfoque ecológico.	3
3.3 Manejo terapéutico de las lesiones de caries.	4
3.4 Probióticos	5
3.5 Modelos para el estudio de caries <i>in vitro</i>	9
3.5.1 Modelos de caries <i>in vitro</i> químicos	10
3.5.2 Modelos de caries <i>in vitro</i> de biopelículas.....	11
3.6 Métodos para evaluar microdureza superficial	13
3.7 Planteamiento del problema.	14
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVO GENERAL.....	16
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
7. METODOLOGÍA.....	17
7.1 Obtención de la muestra.....	17
7.2 Preparación de los bloques de esmalte	18
7.3 Montaje de las muestras.....	19
7.4 Preparación de medios y reactivos.	19

7.5 Estudios de viabilidad y cocultivo de <i>L. rhamnosus</i> GG y <i>S. mutans</i> .	20
7.6 Obtención y procesamiento de la saliva.	21
7.7 Formación de la biopelícula de <i>S. mutans</i> .	22
7.8 Proceso de desmineralización.	24
7.9 Análisis de viabilidad y pureza de los cultivos.	26
7.10 Acidogenicidad de la biopelícula.	27
7.11 Remoción de la biopelícula y almacenamiento de las muestras.	27
7.12 Medición de microdureza superficial.	27
7.13 Análisis estadístico de valores de dureza superficial.	29
8. RESULTADOS	29
8.1 Estudios de viabilidad y cocultivo <i>L. rhamnosus</i> GG y <i>S. mutans</i> .	29
8.2 Formación de la biopelícula en los bloques de esmalte.	31
8.3 Análisis de viabilidad y pureza de los cultivos.	32
8.4 Mediciones de pH.	34
8.5 Resultados de pruebas de microdureza de Vickers.	35
9. DISCUSIÓN	37
10. CONCLUSIONES	41
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
12. ANEXOS	57

1. RESUMEN

Introducción: La caries dental es una enfermedad multifactorial que constituye un gran problema de salud pública. Es debido a esto que es ampliamente investigada y los esfuerzos de la comunidad científica se han visto orientados a encontrar estrategias de intervención que apunten a la estabilización del microambiente por sobre la eliminación completa de la microbiota residente de la cavidad oral. Es en esta línea terapéutica que surgen los probióticos, que ya han demostrado múltiples beneficios en su aplicación en otros sistemas del cuerpo como el gástrico, respiratorio y genitourinario, como una alternativa de terapia biológica capaz de modular el microbioma hacia un estado de eubiosis compatible con salud.

Objetivo: Establecer diferencias en la microdureza superficial de bloques de esmalte humano en un modelo *in vitro* de caries entre los que se les administra probiótico *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG y aquellos a los que no se les aplica.

Metodología: Se simuló un ambiente cariogénico sobre bloques de esmalte usando un modelo de caries *in vitro* monoespecie de *Streptococcus mutans* durante 5 días. El primer grupo correspondió al control negativo y no recibió tratamiento alguno posterior a la formación de la biopelícula de *S. mutans*, el segundo grupo fue el control positivo y fue expuesto a baños de sacarosa 4 veces al día, el tercer grupo se trató como grupo experimental y recibió el tratamiento de probiótico *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG una vez por día, posterior a la exposición a sacarosa. El contenido mineral de los bloques de esmalte fue evaluado mediante prueba de microdureza superficial de Vickers (HV) posterior a la exposición.

Resultados: Los valores de microdureza superficial del grupo de bloques de esmalte expuestos a probióticos *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG resultaron mayores que los del grupo que sólo fue expuesto a sacarosa y menores que los del grupo que no recibió tratamiento posterior a la formación de biopelícula.

Conclusión: *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG tiene la capacidad de inhibir en la desmineralización de la superficie del esmalte. El modelo de caries planteado es útil para el estudio de probióticos y sus efectos en la formación de lesiones de

caries *in vitro*, ya que exhibe la capacidad de generar lesiones de caries e incorporar el uso de los probióticos en las exposiciones, generando diferencias en los valores de microdureza superficial entre las muestras expuestas a probióticos y aquellas que no fueron expuestas.

2. INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad mediada por biopelículas, modulada por azúcares, multifactorial, no transmisible y dinámica, que conduce a la desmineralización y remineralización de los tejidos duros del diente (Selwitz y cols., 2007), la cual se produce por un desbalance del microbioma oral (Simón-Soro y Mira, 2015). Representa la enfermedad oral más prevalente a nivel mundial (James y cols., 2018) y a nivel nacional (Ministerio de Salud, 2019). La teoría de placa ecológica establece que en condiciones de eubiosis la microbiota con potencial patógeno se encuentra presente en pequeñas cantidades, y que frente a cambios en el ambiente que producen estrés ecológico se producen cambios en el microbioma, favoreciendo a especies patógenas en desmedro de la microbiota comensal y promoviendo la degradación de la estructura dentaria (Kilian y cols., 2016). Las estrategias más comunes para la prevención de la aparición de nuevas lesiones de caries corresponden al control de la ingesta de azúcar, el uso de agentes fluorados y el control de los microorganismos mediante métodos químicos, mecánicos y biológicos. Es este control biológico en el que se plantean los probióticos como un mecanismo de modulación de la biopelícula no invasiva y sin efectos adversos (Twetman, 2018).

Los probióticos son definidos por la Organización Mundial de la Salud como “microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren efectos beneficiosos al hospedero” (Philip y cols., 2018). Actualmente se encuentran en varios de los alimentos que consumimos y son usados en diversas industrias, como la alimentaria, la ganadería y, sobre todo en la industria biomédica, mediante la “bacterioterapia” que consiste en la incorporación de una cepa específica al microbioma con la finalidad de producir una regulación específica de los patobiontes (Fierro-Monti y cols., 2017).

La evidencia científica demuestra que el uso de probióticos ha tenido importantes efectos en el tratamiento de enfermedades disbióticas del tracto digestivo, enfermedades respiratorias, enfermedades urogenitales, alergias, intolerancia a la lactosa, e incluso cáncer (Picard y cols., 2005; Sanders, 2008;

Sánchez y cols., 2015; Poorni y cols., 2019; Lee y cols., 2019; Martinović y cols., 2020). A nivel oral, se han estudiado cepas de *Lactobacillus rhamnosus*, administradas con distintos vehículos, y se ha evidenciado un efecto positivo en la prevención de las lesiones de caries, infecciones por *Candida* spp. y enfermedades periodontales (Saha y cols., 2012; Bizzini y cols., 2012; Twetman y cols., 2017).

El objetivo del presente estudio es establecer un modelo *in vitro* para el estudio del potencial de los probióticos de inhibir la desmineralización de la estructura dentaria con la finalidad de encontrar nuevas alternativas preventivas o terapéuticas para abordar la enfermedad de caries desde una perspectiva ecológica.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Caries dental.

Según la Federación Dental Internacional (FDI) la caries dental se define como una enfermedad crónica no transmisible (Twetman, 2018; Pitts y cols., 2021), la cual se encuentra fuertemente asociada a factores socioeconómicos, y al resultado de la interacción de factores genéticos, fisiológicos, ambientales y conductuales (Pitts y cols., 2021) con las bacterias acidogénicas/acidúricas del microbioma oral (Philip y cols., 2018). Producto de esta interacción, los patobiontes producen una mayor cantidad de ácidos orgánicos los cuales alteran el proceso de remineralización dentaria, degradando los cristales de hidroxiapatita que conforman la fase mineral de los tejidos dentarios (Selwitz y cols., 2007; Kilian y cols., 2016; Philip y cols., 2018).

Las enfermedades orales son aquellas que presentan la mayor prevalencia a nivel mundial y según el análisis del *Global Burden of Disease Study* (GBD) realizado por James y cols. en 2018, las lesiones de caries son la enfermedad más prevalente de las que se presentan en la cavidad oral (James y cols., 2018). En Chile, según los datos de la *Encuesta Nacional de Salud 2016 – 2017* (ENS), las lesiones de caries cavitadas se presentan en un 54,6% de la población (Ministerio

de Salud, 2019); estos datos demuestran que las lesiones de caries constituyen un relevante problema de salud pública, tanto a nivel nacional como internacional.

3.2 Caries dental según un enfoque ecológico.

En la cavidad oral se presentan condiciones que predisponen a la colonización de una gran diversidad de microorganismos, describiéndose más de 700 taxones que conforman la microbiota oral, los cuales se agrupan formando biopelículas que, según sus condiciones, presentan predilección por organizarse a nivel de surco gingival o bien a nivel coronal de la superficie dentaria (Simón-Soro y Mira, 2015; Kilian y cols., 2016; Twetman, 2018; Thurnheer y Paqué, 2021). Pese a esta elevada colonización y complejos niveles de organización bacteriana, la presencia de un gran número de bacterias no implica necesariamente un estado de enfermedad, ya que en gran parte nuestra microbiota residente establece una relación de mutuo beneficio con su nosotros, un estado de equilibrio llamado eubiosis, en el cual incluso los patobiontes se encuentran presentes (Selwitz y cols., 2007; Kilian y cols., 2016; Philip y cols., 2018; Marsh, 2018). Sin embargo, este equilibrio puede alterarse por agentes externos, como el consumo de azúcar, la disminución del pH o la escasez del flujo salival, que causan un estado de estrés ecológico, que desencadena la disbiosis entre el hospedero y la microbiota oral en el que se ven favorecidas las bacterias acidogénicas y acidófilas en desmedro de las especies comensales que contribuyen a mantener el equilibrio del microbioma (Rosier y cols., 2014; Simón-Soro y Mira, 2015; Kumar y Mason, 2015; Kilian y cols., 2016; Philip y cols., 2018; Twetman, 2018; Pitts y cols., 2021).

Cuando se produce este estado disbiótico las bacterias con potencial patogénico aumentan su actividad metabólica, degradando azúcares y produciendo ácidos orgánicos, los cuales producen una disminución del pH, es decir, un ataque ácido a los tejidos duros del diente, alterando el normal equilibrio entre el proceso de degradación y formación de mineral en la superficie dentaria, favoreciendo la desmineralización del tejido dentario (Selwitz y cols., 2007; Kilian y cols., 2016; Philip y cols., 2018).

3.3 Manejo terapéutico de las lesiones de caries.

Esta perspectiva ecológica de la enfermedad de caries en la que se entiende como una enfermedad disbiótica, ha impactado significativamente en la forma en que tratamos la enfermedad y las lesiones de caries, pasando desde una perspectiva invasiva que contemplaba realizar necesariamente un tratamiento restaurador o rehabilitador (Frencken, 2017; Schwendicke, 2019), a una odontología mínimamente invasiva (OMI) que busca mantener o restablecer el estado de eubiosis a través del control de los factores que puedan ser controlados tanto por el profesional como por el paciente (Frencken, 2017; Twetman, 2018). Para apuntar a restablecer este equilibrio perdido se han implementado en los últimos años terapias para la prevención de las lesiones de caries, como el uso de fluoruros, la modificación de las conductas alimentarias, el control mecánico de las biopelículas bacterianas y terapias biológicas como la modulación del microbioma a través de antisépticos orales y el uso de pre y probióticos (Glenn y Glenn, 1994; Simón-Soro y Mira, 2015; Philip y cols., 2018; Twetman, 2018; Pitts y cols., 2021).

La modulación del microbioma oral busca fomentar el equilibrio entre los microorganismos residentes y el hospedero, promoviendo estados de salud favorables (Twetman, 2018). Sin embargo, la acción inespecífica de los antisépticos orales es capaz de afectar de igual manera a organismos patobiontes y a aquellos que traen beneficio para la salud del hospedero, generando una desestabilización del microbioma que puede dar paso a infecciones por organismos oportunistas o a otros efectos clínicos indeseados (Glenn y Glenn, 1994; Simón-Soro y Mira, 2015; Twetman, 2018), motivo por el que se recomienda que el uso de antisépticos orales debe ser siempre indicado por el profesional por periodos cortos de tiempo, en bajas concentraciones y en conjunto al adecuado control mecánico de la biopelícula; y no como una terapia de prevención en sí misma (Simón-Soro y Mira, 2015; Twetman, 2018). Producto de esta falencia de los antisépticos orales se ha propuesto el uso de probióticos como una terapia preventiva, ya que han demostrado la capacidad de alterar selectivamente el microbioma mediante la adición de cepas bacterianas específicas, las cuales modulan el ambiente en uno más saludable y balanceado

(Sanders, 2008; Simón-Soro y Mira, 2015; Fierro-Monti y cols., 2017; Twetman, 2018; Twetman y Jørgensen, 2021).

3.4 Probióticos

Los probióticos son definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO) como “microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren efectos beneficiosos al hospedero” (Food and Agriculture Organization of the United Nations. y World Health Organization., 2006; Sanders, 2008; Sánchez y cols., 2015; Rodríguez y cols., 2016; Philip y cols., 2018) y actualmente forman parte importante de nuestra vida, debido a su presencia en una gran variedad de procesos, son ampliamente usados en la industria alimentaria, la ganadería, la agricultura y en la industria biomédica (Food and Agriculture Organization of the United Nations. y World Health Organization., 2006; Sánchez y cols., 2015).

Fueron propuestos como agentes de salud por primera vez en 1907 por el microbiólogo ucraniano Iliá Méchnikov, quien en su trabajo ganador del premio Nobel señaló que *“la dependencia de los microorganismos intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles”* (Food and Agriculture Organization of the United Nations. y World Health Organization., 2006) y acuñó el término “probiótico” a partir de las palabras en latín *Pro* y *Biotos*, literalmente, “a favor de la vida” (Philip y cols., 2018).

En la industria biomédica los probióticos se presentan como una alternativa preventiva y para el tratamiento de enfermedades de origen disbiótico (Picard y cols., 2005; Sanders, 2008; Christensen y Brüggemann, 2014; Sánchez y cols., 2015; Poorni y cols., 2019; Lee y cols., 2019; Martinović y cols., 2020), y son especialmente utilizados e investigados en enfermedades del tracto digestivo como colon irritable (O’Mahony y cols., 2005; Whorwell y cols., 2006; Hidalgo-Cantabrana y cols., 2017; Yao y cols., 2021), aunque también para enfermedades del sistema

respiratorio (Lim y Shin, 2020; Budden y cols., 2022), enfermedades urogenitales (Brubaker y Wolfe, 2017), alergias (Eslami y cols., 2020), intolerancia a la lactosa, colitis asociada a antibióticos (Selinger y cols., 2013), e incluso como alternativa preventiva y terapéutica para cánceres gastrointestinales, hepáticos y mamarios (Reddy y Rivenson, 1993; Singh y cols., 1997; Zhang y cols., 2012; An y cols., 2020).

Esta modulación del microambiente es realizada por parte de los organismos probióticos a través de diversos mecanismos, siendo el más importante la formación de biopelículas que colonizan los tejidos epiteliales, compiten por los nutrientes e impiden la agregación de microorganismos patobiontes (Lin y cols., 2018; Maldonado Galdeano y cols., 2019; Zommiti y cols., 2020; Yadav y cols., 2022). La colonización de organismos probióticos como *Streptococcus termophilus* y *Lactobacillus acidophilus* puede resultar beneficiosa para fortalecer la unión epitelial mediante la fosforilación de las proteínas involucradas en la adhesión celular epitelial presentes en la *zona occludens*, como la actinina y la ocludina (Resta-Lenert, 2003)

Otra forma relevante a través de la cual los probióticos modulan el microbioma es mediante la inmunomodulación, ya que se ha demostrado la capacidad de los organismos probióticos de influir en la respuesta inflamatoria y la respuesta inmune, principalmente mediante la estimulación de las células dendríticas en la producción de citocinas, estimulando así la diferenciación y supervivencia de los linfocitos T (Eslami y cols., 2019) . Se ha descrito que *Bifidobacterium animalis* y *Bifidobacterium longum* pueden estimular la liberación de interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) por parte de las células dendríticas, mientras que *Bifidobacterium bifidum* puede activar linfocitos Th17 a través de la liberación de interleucina 17 (IL-17) (Baba y cols., 2008).

Además, se ha evidenciado la capacidad de los probióticos de producir sustancias capaces de inhibir el crecimiento bacteriano como son los ácidos orgánicos como el ácido acético y ácido láctico que poseen capacidad inhibitoria sobre bacterias Gram negativo como *Helicobacter pylori* (Maldonado Galdeano y cols., 2019), ácidos grasos de cadena corta como butirato y acetato que disminuyen

los niveles de inflamación y mejoran la unión celular y la integridad de la barrera epitelial (Eslami y cols., 2020), también se producen otros compuestos con capacidades antimicrobiales como anhídrido carbónico, peróxido de hidrógeno, acetaldehído, acetoína, diacetilo y bacteriocinas (Yadav y cols., 2022).

Las bacteriocinas son pequeñas proteínas o péptidos que son sintetizados por los ribosomas bacterianos y que poseen propiedades antimicrobianas en espectros variables, sin embargo, se ha descrito que poseen la capacidad de afectar especies de los géneros *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, entre otros (Dai y cols., 2021; Fathizadeh y cols., 2022). Estas bacteriocinas actúan de dos formas principalmente, la primera de ellas es atacando la membrana celular del microorganismo, ya sea con una proteína blanco-específica o mediante perforación; mientras que la segunda es mediante la destrucción directa de componentes distintos a la membrana celular, pero igualmente importantes en el ciclo de vida del microorganismo, como pueden ser enzimas que participan de la replicación del material genético (Dai y cols., 2021). Algunas de las bacteriocinas descritas que son fabricadas por probióticos son: Lactacina B que es producida por *L. acidophilus*, Bifidocina B por *B. bifidum* NCFB, Plantaricina por *Lactiplantibacillus plantarum*, Nisina por *Lactococcus lactis* (Maldonado Galdeano y cols., 2019) y Pentocina por *Lactiplantibacillus pentosus* (Dai y cols., 2021)

Debido a este potencial de los probióticos en la prevención y tratamiento de enfermedades disbióticas es que se han comenzado a investigar como alternativas de tratamiento para las principales enfermedades crónicas de la cavidad oral que presentan un origen disbiótico, las enfermedades periodontales y la enfermedad de caries, mostrando resultados favorables (Saha y cols., 2012; Bizzini y cols., 2012; Twetman y cols., 2017; Zaura y Twetman, 2019).

Respecto a las enfermedades periodontales la evidencia demuestra el efecto positivo del consumo de probióticos sobre estas, obteniendo como resultado la disminución en los parámetros clínicos de la enfermedad periodontal en pacientes usando cepas de *Levilactobacillus brevis* CD2 (Riccia y cols., 2007),

Limosilactobacillus reuteri cepas DSM17938 y ATCC PTA5289 (Teughels y cols., 2013) y *Ligilactobacillus salivarius* WB21 (Shimauchi y cols., 2008)

En lo que respecta al uso de probióticos para la prevención y el tratamiento de caries, se han realizado estudios mediante modelos *in situ* y ensayos clínicos, tanto en niños como en adultos evaluando la acción de *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. animalis*, por periodos de días, semanas y meses, realizando recuento de *Streptococcus mutans* como principal indicador de resultados (Cagetti y cols., 2013; Laleman y cols., 2014; Hoffmann y Daniels, 2017; Twetman y cols., 2017; Coqueiro y cols., 2018), siendo menos los estudios que utilizan el desarrollo de caries como indicador (Haslöf y Stecksén-Blicks, 2020).

En 2001, Näse utilizó una cepa de probióticos *L. rhamnosus* GG (LGG) (10^5 UFC/mL) en 595 niños de 1 a 6 años, utilizando como vehículo para su administración leche fermentada durante 7 meses, obteniendo como resultado una disminución significativa en el riesgo cariogénico por parte del grupo experimental (Näse y cols., 2001).

Luego, en 2009, Stecksén realizó un ensayo clínico aleatorizado en el que administró durante 12 meses una combinación de leche fermentada por *L. rhamnosus* LB21 (10^7 UFC/mL) fortalecida con flúor (2,5 mg/L) a 248 niños entre 1 y 5 años, obteniendo una menor prevalencia e incidencia de caries en el grupo intervenido, no obstante, no se presentó una diferencia significativa en el recuento de *S. mutans* ni de lactobacilli. Sin embargo, en este estudio es imposible determinar el potencial de *L. rhamnosus* para la prevención de caries, ya que la disminución de las lesiones de caries puede asociarse a la exposición al flúor y a sus ya demostradas propiedades remineralizadoras (Stecksén-Blicks y cols., 2009).

En 2016, Rodríguez y colaboradores realizaron un ensayo clínico aleatorizado en que se administró a 261 niños entre 2 y 3 años leche suplementada con *L. rhamnosus* SP1 (10^7 UFC/mL) durante 10 meses, obteniendo como resultado una incidencia de lesiones de caries significativamente menor en el grupo

experimental, corroborando así los resultados obtenidos por Näse en 2001 (Rodríguez y cols., 2016).

Otro indicador utilizado para evaluar la efectividad de los probióticos fue utilizado por Wattanarat y colaboradores en 2015, quienes evaluaron los niveles de Péptido de Neutrófilos Humano 1-3 (HNP1-3), el cual es una pequeña molécula catiónica con propiedades antimicrobianas que se encuentra en la saliva y se ha visto asociada a sujetos libres de caries (Tao y cols., 2005). En este estudio se administró leche suplementada con *L. paracasei* SD1 (10^8 UFC/mL) a 246 niños por 12 meses, obteniendo como resultado que el grupo probiótico mostró un aumento significativo de HNP1-3 en saliva, una disminución en el recuento de *S. mutans* y una disminución de la incidencia de caries (Wattanarat y cols., 2015).

Entre 2019 y 2020, en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (FOUCH) los estudios realizados por Colil, Azán y Seguel utilizaron cepas de *L. rhamnosus* SP1 (10^8 UFC/mL) de forma tópica y sistémica en un modelo *in situ*, en los que se pudo constatar que los bloques de esmalte expuestos a sacarosa y probióticos presentaban una mayor densidad mineral y microdureza superficial, además de una morfología superficial menos porosa cuando se comparaban con aquellos bloques de esmalte que habían sido expuestos únicamente a sacarosa (Azán, 2019; Colil, 2019; Seguel, 2020).

También en la FOUCH, las investigaciones *in situ* realizadas por Aliaga y Naveillán en 2020 y por Tobar en 2022 demostraron la capacidad de *L. rhamnosus* SP1 (10^8 UFC/mL) para atenuar la progresión de la desmineralización del esmalte dentario en procesos de caries ya iniciados (Aliaga, 2020; Naveillán, 2020; Tobar, 2022).

3.5 Modelos para el estudio de caries *in vitro*.

Un modelo de estudio se define como un experimento o prueba para analizar los eventos biológicos y/o químicos responsables o asociados a un determinado efecto. Los modelos de desmineralización-rem mineralización exploran los mecanismos moleculares y fisiológicos con los cuales diversas sustancias producen

cambios en los dientes (Yu y cols., 2017). El uso de estos modelos para el estudio de caries nos entrega herramientas valiosas para investigar los procesos de una forma más económica, rápida, y evitando parcialmente las limitaciones éticas asociadas a la experimentación clínica (Sønju Clasen y Øgaard, 1999), facilitando la orientación de estrategias de prevención o tratamiento de la enfermedad de caries de una forma eficiente al estudiar sus diversos aspectos por separado (Ten Cate, 2015).

Un modelo de estudio debe cumplir con la necesidad de capturar y reproducir los elementos esenciales del fenómeno a investigar, ser robusto, reproducible y confiable comparado al sistema para el que esté diseñado (Ten Cate, 2015). Para el estudio de caries se han utilizado modelos *in vitro* o de laboratorio, *in vivo* o modelos animales, y modelos *in situ* en humanos (Marsh, 1995). En 2017 Yu y cols. realizaron una medición al respecto de cuáles eran los modelos más utilizados para el estudio de caries, obteniendo que los más utilizados son los modelos *in vitro*, que comprenden un 84% del total de los estudios que se encontraban indexados entre 2014 y 2016 en la Web of Science; le seguían los estudios *in situ* con un 15%, siendo los menos utilizados los modelos *in vivo*, comprendiendo sólo el 1% (Yu y cols., 2017).

Los modelos *in-vitro* permiten estudiar de forma separada las distintas variables que influyen en el proceso de formación de caries, controlando cada aspecto por separado (Zero, 1995), lo que nos entrega una alta precisión y sensibilidad. Los modelos de caries *in vitro* se clasifican, según el agente desmineralizante, en dos grandes grupos, cada uno con sus propias clasificaciones: modelos químicos y modelos de biopelículas.

3.5.1 Modelos de caries *in vitro* químicos

Los modelos químicos son aquellos que emulan el proceso de la caries a través del uso directo de agentes ácidos y soluciones *buffer* para estimular los procesos de desmineralización y remineralización, respectivamente (Yu y cols., 2017). Según el estudio de Yu y cols. los modelos químicos representan el 87% de

los modelos *in vitro*, y estos a su vez se subdividen en modelos de mineralización simple en el 62% de los casos y modelos de pH cíclico en el 38% restante (Yu y cols., 2017).

Los modelos de mineralización simple son aquellos en que se utilizan ácidos orgánicos de pH bajo, como ácido láctico o ácido acético, o geles de sílice (Moron y cols., 2013; Skucha-Nowak y cols., 2015), para producir lesiones por desmineralización en tejidos dentarios o discos de hidroxiapatita. Posteriormente se produce la saturación de minerales en el medio, ocasionada por acción de los ácidos, y con esta saturación mineral se genera un estado de balance dinámico en el proceso de desmineralización-remineralización (Skucha-Nowak y cols., 2015; Yu y cols., 2017). Estos modelos son ampliamente utilizados debido a que requieren menos tiempo y pasos en el experimento, sin embargo, las lesiones obtenidas en estos modelos, aunque aceptables, han demostrado tener una mayor pérdida mineral que las lesiones de caries naturales (Schwendicke y cols., 2015).

Por otra parte, los modelos de pH cíclico se basan en el mecanismo propuesto por Ten Cate y Duijsters en 1982 para investigar el efecto del Fluoruro de Sodio y su potencial remineralizante, en este procedimiento a sustratos dentarios se les realizan periodos de exposición a soluciones de bajo pH y luego a soluciones remineralizantes, con la finalidad de replicar los procesos de desmineralización-remineralización en una forma más fiel a como ocurre en la boca (Ten Cate y Duijsters, 1982).

Pese a que ambos modelos químicos cumplen con la capacidad de generar lesiones a los tejidos duros de similares características a las lesiones de caries, carecen de un elemento que es crucial en la enfermedad de caries, la presencia de microorganismos (Bowden, 1995).

3.5.2 Modelos de caries *in vitro* de biopelículas

Los modelos de biopelículas son aquellos en los que se inducen lesiones de caries utilizando microorganismos cariogénicos que forman biopelículas en tejidos duros mediante la exposición a azúcares fermentables (Amaechi y cols., 2019).

Representan una importante herramienta para el estudio de agentes antimicrobianos, así como de las propiedades mismas de la biopelícula y su metabolismo (Ccahuana-Vásquez y Cury, 2010; Amaechi y cols., 2019). También se han utilizado para investigar los distintos efectos del flúor en la remineralización de los tejidos dentarios (Ccahuana-Vásquez y Cury, 2010; Giacaman y cols., 2012; Cavalcanti y cols., 2014; Botelho y cols., 2016) Según el análisis de Yu y cols. los modelos de biopelículas representan un 13% del total de los estudios *in vitro* (Yu y cols., 2017).

Los modelos de biopelículas se pueden clasificar según diferentes criterios. Según la composición de biopelícula se pueden encontrar modelos monoespecie o multiespecie, según la duración del modelo se clasifican en modelos de corto y largo plazo, según la forma de exposición a azúcar se dividen en modelos de exposición continua o exposición intermitente, y según el flujo del medio se separan en modelos estáticos o dinámicos. Cada una de estas clasificaciones tiene a su vez distintas subclasificaciones más específicas según el procedimiento específico del modelo en cuestión (Maske y cols., 2017).

El modelo de caries *in vitro* planteado y validado por Ccahuana-Vásquez y Cury en 2010 presenta ciertas ventajas que lo hacen particularmente útil para la investigación con biopelículas:

- Se encuentra validado en primera instancia para el uso de clorhexidina (Ccahuana-Vásquez y Cury, 2010), y posteriormente ha sido validado en el estudio de los efectos del fluoruro en la desmineralización (Fernández y cols., 2016), el efecto antimicrobiano del hierro (Ribeiro y cols., 2012) y otros productos naturales (Peralta y cols., 2017), y los efectos de la dieta y su potencial cariogénico (Giacaman y cols., 2012; Muñoz-Sandoval y cols., 2012; Cavalcanti y cols., 2014; Botelho y cols., 2016).
- Usa sustrato dentario para la evaluación de desmineralización (Ccahuana-Vásquez y Cury, 2010).
- Las exposiciones a azúcar son intermitentes, simulando los periodos de “festín y hambre” que presentan las biopelículas en el medio oral, realizando

exposiciones periódicas controladas a sacarosa, con la finalidad de simular la exposición real a carbohidratos y ciclos de pH que se producen en la cavidad oral asociadas a la ingesta de alimentos; a diferencia de modelos en los que *S. mutans* se encuentran expuestos de forma constante a carbohidratos y, por ende, la biopelícula se encuentra constantemente sometida a estrés ácido (Ccahuana-Vásquez y Cury, 2010).

- El sustrato dentario se encuentra suspendido mediante alambres en su pocillo y no en el fondo, lo que favorece una formación adecuada de la biopelícula, además de facilitar otros procesos como la medición de pH u otros indicadores de actividad de la biopelícula, remoción del medio, entre otras (Ccahuana-Vásquez y Cury, 2010; Amaechi y cols., 2019).

Aunque este sea un modelo estático, debido a que el medio no se mueve durante los procesos de la biopelícula, el caldo es renovado periódicamente durante el experimento y el ataque ácido tampoco es constante, por lo que se puede considerar un modelo cíclico (Amaechi y cols., 2019).

3.6 Métodos para evaluar microdureza superficial

La dureza representa la resistencia de un cuerpo a rayones y/o la indentación. Las pruebas de dureza son aquellas que miden la resistencia a la penetración de la superficie de un material por parte de un objeto duro (Askeland y Wright, 2016). Al momento de realizar una prueba de dureza, nuestro resultado es la huella dejada por este indentador sobre el material, cuanto mayor sea en extensión o profundidad, menor dureza presenta la superficie del cuerpo analizado (Callister y Rethwisch, 2018).

Existen distintas pruebas de dureza que varían según la carga efectuada y el material utilizado para realizar la indentación (Askeland y Wright, 2016), por este motivo ciertas pruebas se recomiendan para materiales o condiciones específicas, como serían las pruebas de microdureza superficial de Knoop y de Vickers, en las que se utilizan pequeños diamantes de forma piramidal para realizar indentaciones

microscópicas, haciendo necesario el uso de un microscopio para la realización del ensayo (Askeland y Wright, 2016; Callister y Rethwisch, 2018).

La prueba de dureza de Vickers, abreviada como HV, se realiza ubicando la muestra a analizar sobre una plataforma, luego se ajustan los parámetros de tiempo y fuerza (F), se ajusta el microdurómetro usando el microscopio y luego se aplica la carga. Posterior a la indentación, se miden las diagonales (d) y se aplican a la ecuación de microdureza de Vickers:

$$HV = \frac{1,8544 \times F}{d^2}$$

HV: Dureza de Vickers. F: Fuerza aplicada. d²: Promedio de las diagonales al cuadrado

Los valores obtenidos usando el ensayo de microdureza de Vickers se han correlacionado con la cantidad mineral del tejido dentario (Davidson y cols., 1974) Además, se ha utilizado como prueba en diversos estudios en los que se ha sometido esmalte a modelos de desmineralización-remineralización (Jara, 2017; Padilla, 2018) y ha sido usado para evaluar el tejido dentario sometido a agentes desmineralizadores (Collys y cols., 1992; Tobar, 2022). La versatilidad de su uso la ha convertido en una técnica muy recurrente para evaluar cambios en el esmalte que se reflejan en su contenido mineral.

3.7 Planteamiento del problema.

Entendiendo la enfermedad de caries como un serio problema de salud pública actual, con consecuencias que a largo plazo pueden resultar irreparables y de un alto costo tanto para las personas como para los estados, se hace necesario buscar alternativas que nos permitan un adecuado manejo de la enfermedad mediante la prevención y el tratamiento de esta, especialmente en estadios tempranos.

El cambio de paradigma en la forma en que entendemos y abordamos la enfermedad de caries nos obliga como odontólogos no sólo al desarrollo de nuevos materiales para la restauración o la rehabilitación, sino también a buscar formas costo efectivas para prevenir la formación de futuras lesiones, acá es donde juega

un rol decisivo entender los procesos biológicos que llevan al desequilibrio del microbioma oral y enfocar nuestros esfuerzos en la búsqueda de terapias de tipo biológico que no dañen nuestro ecosistema oral, sino que busquen impulsar la predominancia de especies beneficiosas para el hospedero por sobre las con potencial patogénico. Es en este contexto que se postula a los probióticos LGG como una terapia preventiva de la enfermedad de caries, ya que su potencial como terapia biológica ha sido demostrado en otros sistemas como el digestivo, respiratorio y genitourinario. Sin embargo, para poder verificar la capacidad de los probióticos en el control de la enfermedad de caries se hacen necesarios estudios clínicos, los cuales llevan un alto costo asociado, por lo que un estudio previo *in vitro* para evidenciar el potencial se vuelve crucial para evaluar la inversión en futuros ensayos clínicos.

Nos hemos propuesto resolver la siguiente pregunta de investigación:
¿Existen diferencias en la microdureza superficial entre bloques de esmalte expuestos a probióticos LGG y aquellos no expuestos en un modelo de desmineralización microbiológico *in vitro*?

4. HIPÓTESIS

Bloques de esmalte humano tratados con sacarosa y probióticos *LGG* presentan mayores valores de microdureza superficial cuando se comparan con bloques de esmalte tratados únicamente con sacarosa.

5. OBJETIVO GENERAL

Establecer diferencias en la microdureza superficial de bloques de esmalte humano en un modelo *in vitro* de caries entre los que se exponen a probiótico *LGG* y aquellos a los que no se les expone.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la microdureza superficial de bloques de esmalte humano que se les expone a probióticos *LGG* en un modelo *in vitro* de caries.
- Determinar la microdureza superficial de bloques de esmalte humano expuestos únicamente a sacarosa.
- Determinar la microdureza superficial de bloques de esmalte humano no expuestos a sacarosa.
- Comparar la microdureza superficial de los bloques de esmalte humano del grupo experimental y los grupos control.

7. METODOLOGÍA

Este es un estudio experimental *in vitro* en el que se utilizó una adaptación del modelo de caries descrito por Ccahuana-Vásquez y Cury en 2010, en el que se llevó a cabo la simulación de un ambiente cariogénico en bloques de esmalte humano, previa formación de una biopelícula monoespecie de *S. mutans*, los cuales fueron expuestos 4 veces al día a baños de sacarosa al 10% y una vez al día a *L. rhamnosus* GG de manera tópica, por instilación, para el grupo experimental, en caso del control positivo sólo se expuso a baños de sacarosa 10%, mientras que el control negativo, no fue expuesto a sacarosa ni probióticos. Los bloques de esmalte se obtuvieron de terceros molares incluidos y fueron evaluados a través de prueba de dureza de Vickers posterior a la exposición.

7.1 Obtención de la muestra

Para el cálculo de tamaño muestral se tomó en consideración la microdureza superficial como variable primaria de estudio, con los siguientes aspectos: desviación estándar 28.9, riesgo alfa de 0,05 y un riesgo beta de 0,2 en un contraste unilateral, estimado una tasa de pérdidas de seguimiento del 5%, por lo cual se necesitan 10 bloques para cada grupo haciendo necesario un total de 30 bloques de esmalte.

Las muestras se obtuvieron a partir de terceros molares incluidos (nunca expuestos al medio oral), proporcionados voluntariamente por pacientes sometidos a exodoncia por indicación de ortodoncia en el "Instituto Nacional de Ortodoncia". Los donantes firmaron un consentimiento informado aprobado por el comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo N°1). Los terceros molares donados fueron examinados individualmente para seleccionar aquellos que no presentaran anomalías, dejando de lado aquellos dientes que presentaran defectos en el esmalte, desmineralizaciones o fracturas. Aquellos molares seleccionados permanecieron en una solución de timol 2% refrigerados a 5°C para conservarlos hasta el momento de su uso.

Los molares seleccionados fueron limpiados de posibles restos de tejido periodontal usando instrumental manual de periodoncia, jacquette y curetas gracey 3/4, y luego fueron almacenados en la solución de timol 2% y refrigerados a 5°C.

7.2 Preparación de los bloques de esmalte

Utilizando instrumental rotatorio de alta velocidad con piedra de diamante de grano azul de forma aguja (ISO 806.314.166.524.012) se realizaron cortes abarcando la totalidad de las caras mesial y distal de cada molar, con la finalidad de obtener las superficies menos convexas de las piezas dentarias. Posteriormente, usando instrumental de baja velocidad y disco de carburo de silicio (carburundum), con abundante refrigeración, se realizó el desgaste necesario para obtener bloques de esmalte con sustento dentinario adyacente de 3x3x3 mm (Figura 1), los cuales fueron posteriormente almacenados de forma unitaria en tubos de microcentrífuga de 2 mL con solución de timol 2%, rotulados y conservados a 5°C, transcurrida una semana se realizó una nueva inspección visual para descartar aquellas muestras que presentaran daños o defectos estructurales del esmalte.

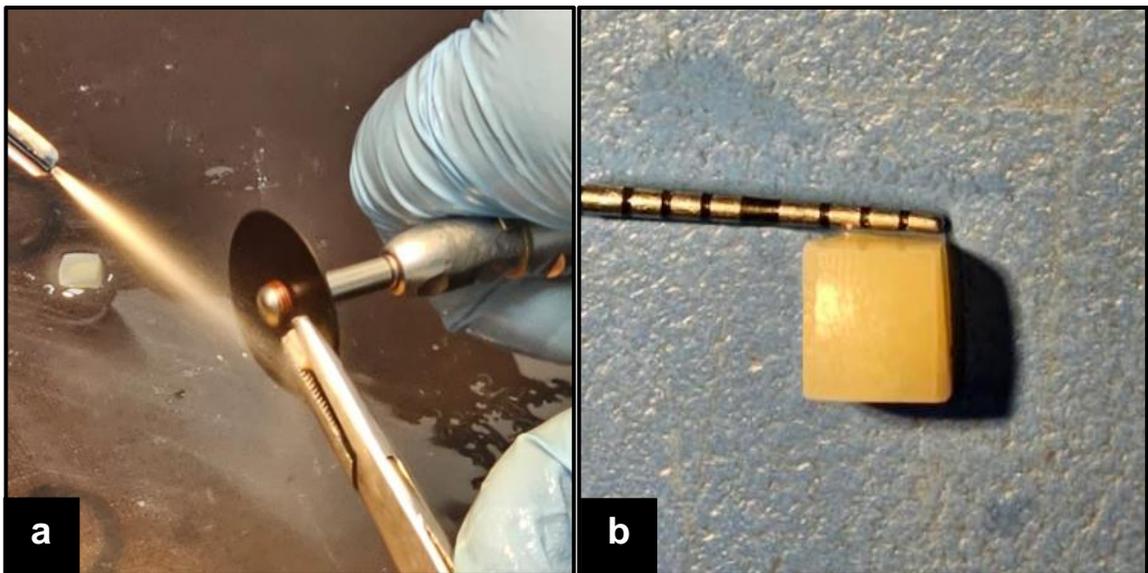


Figura 1. Proceso de corte de muestras. a) Rectificación de bordes con abundante refrigeración. b) Bloque recortado a aprox. 3x3 mm con sustento en dentina.

7.3 Montaje de las muestras.

Utilizando alambre de ortodoncia de diámetro 0,8 mm se confeccionó un armazón metálico para cada bloque de esmalte, estas estructuras metálicas permitieron mantener los bloques de esmalte en suspensión al interior de pocillos de placas de polietileno para cultivo. Los bloques fueron adheridos por la cara dentinaria, utilizando adhesivo universal (One Coat Bond SL, Coltene) y resina compuesta fluida (Filtek™ Supreme Flowable, 3M™), esto fue realizado en el laboratorio preclínico de la FOUC. Para este procedimiento no se realizó grabado ácido con la finalidad de no perjudicar la estructura del esmalte.



Figura 2. Bloque de esmalte montado adherido a su alambre.

Luego de unido cada bloque a su armazón metálico, se depositó en un tubo centrífuga de 50 mL con 20 mL de agua destilada, al interior del cual fue esterilizado en autoclave a 120°C por 20 minutos y posteriormente mantenido hasta el momento de iniciada la fase experimental.

7.4 Preparación de medios y reactivos.

Para las etapas siguientes del estudio se realizó una planificación de los medios de cultivo y reactivos a utilizar, por lo que, según indicaciones del fabricante, se prepararon múltiples placas de agar TYCS (Triptona, Levadura, Cisteína, Sacarosa) y agar MRS en campana de flujo laminar, a modo de disminuir el riesgo de contaminación. También se preparó caldo de Infusión Cerebro Corazón (BHI, por sus siglas en inglés *Brain Heart Infusion*), caldo BHI adicionado con glucosa 0,1 mM

(BHI+G), y sacarosa 10%, los cuales fueron esterilizados en autoclave; además, se dispensaron y esterilizaron volúmenes de agua destilada y de suero fisiológico.

7.5 Estudios de viabilidad y cocultivo de *L. rhamnosus* GG y *S. mutans*.

Previo al inicio de la fase experimental se realizaron estudios con la finalidad de demostrar la viabilidad y la capacidad de *L. rhamnosus* GG (Vivera®, Merck) (5×10^9 UFC) de coexistir con *S. mutans*.

Para el estudio de viabilidad se realizó la preparación del probiótico comercial Vivera®, un sobre de probiótico se reconstituyó en 200 mL de agua, de esta preparación se tomaron 100 μ L y se sembró en césped en agar MRS, medio selectivo para el crecimiento de bacterias de la familia *Lactobacillaceae*, como *Lactocaseibacillus* spp., además se sembró 100 μ L en 3 mL de caldo BHI. Ambas siembras se incubaron en ambiente de microaerofilia en la incubadora ZDP-A2080 (Zicheng, China) a 37°C; una vez transcurridas 24 horas se evidenció crecimiento de colonias de LGG en el agar MRS, y un aumento en la turbidez del caldo, por lo que se procedió a continuar con los estudios de cocultivo.

Para los estudios de cocultivo se utilizó la siembra previa de LGG en conjunto con la cepa ATCC 25175 de *S. mutans* perteneciente al cepario de la Dra. Patricia Palma Fluxá del Laboratorio de Microbiología e Inmunología Oral (LabMIO) de la FOUC. Desde un cultivo de *S. mutans* criopreservado en glicerol 100% a -80°C se extrajeron 100 μ L, los cuales fueron sembrados en césped en agar TYCS y luego se incubó en ambiente de microaerofilia por 24 horas, transcurrido dicho tiempo, al evidenciar formación de colonias se traspasaron 5 colonias a 3 mL de caldo BHI para nuevamente ser incubado en ambiente microaerófilo por 24 horas.

Transcurridas 24 horas posteriores a la siembra en caldo y habiendo evidenciado crecimiento en caldo BHI tanto de LGG como de *S. mutans*, ambos cultivos fueron igualados en turbidez a 0,5 McFarland mediante espectrofotometría utilizando el espectrofotómetro UV-VIS de haz dividido Halo RB-10 (Dynamica, Australia) utilizando caldo BHI como blanco y una longitud de onda de 600 nm (Figura 3a).

Una vez igualados ambos cultivos a 0,5 McFarland se sembraron 100 μ L de cada uno en 3 mL de caldo BHI (Figura 3b) y se incubaron en ambiente de microaerofilia a 37°C por 24 horas, tras lo cual, evidenciado el crecimiento de microorganismos en caldo se homogeneizó y se realizó la siembra de 100 μ L del cultivo en agar MRS y en agar TYCS, para evidenciar la presencia de LGG y *S. mutans*, respectivamente, ambas siembras fueron incubadas en ambiente microaerófilo a 37° por 24 horas, posteriormente se les realizó análisis morfológico macro y microscópico para comprobar que fueran LGG y *S. mutans*.

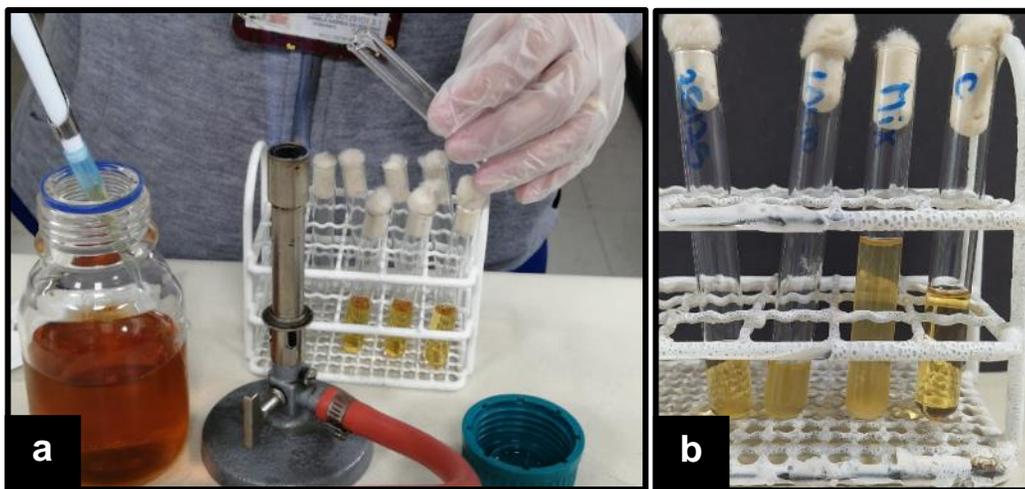


Figura 3. Proceso de homogeneización a 0,5 McFarland. a) Adición de caldo BHI para lograr turbidez requerida. b) Caldos homogeneizados a 0,5 McFarland, de izquierda a derecha *S. mutans*, LGG, mezcla de *S. mutans* y LGG, y control de cultivo.

7.6 Obtención y procesamiento de la saliva.

Para la formación de la biopelícula los bloques de esmalte fueron previamente inmersos en saliva humana para generar película salival adquirida. La saliva fue donada voluntariamente por tres individuos libres de enfermedades sistémicas, libres de caries, no fumadores, sin consumo de antibióticos en los últimos tres meses y que no habían ingerido líquidos o alimentos al menos 2 horas antes de la recolección, además de haber realizado una adecuada higiene oral. La saliva de los tres fue mezclada, obteniendo un pool de saliva con la finalidad de minimizar posibles diferencias que se pudieran presentar en la composición de la saliva a la que se expondrían los bloques posteriormente.

La saliva donada fue centrifugada a 4500 RPM por 20 minutos a 4°C en la centrífuga Megafuge™ 8R (Heraeus™, Thermo Scientific, Alemania), luego se extrajo el sobrenadante y se procedió a filtrarla utilizando filtros tipo *Syringe Filter* de 0,22 µm marca EDLAB® CA. El filtrado se realizó manualmente aplicando fuerza controlada sobre el émbolo de la jeringa (Figura 4) y una vez terminada se realizó la siembra de 100 µL de saliva filtrada en una placa de agar sangre para posteriormente incubarla por 24 horas a 37°C en condiciones de microaerofilia y otros 100 µL fueron sembrados en una placa de agar sangre que fue incubada en condiciones aerobias por 24 horas a 37°C.



Figura 4. Filtrado manual de saliva utilizando filtros 0,22 µm y presión manual.

El proceso de filtrado se realizó hasta que no se evidenciaran colonias de microorganismos en el agar sangre; una vez obtenida saliva sin presencia de microorganismos se almacenó refrigerada a 4°C hasta el momento de su utilización en la formación de la biopelícula.

7.7 Formación de la biopelícula de *S. mutans*.

Para la formación de la biopelícula monoespecie de *S. mutans* se utilizó la cepa ATCC 25175 proporcionada por la Dra. Patricia Palma de LabMIO.

En una placa de agar TYCS se inoculó 100 μ L provenientes de un cultivo líquido de *S. mutans* ATCC 25175 criopreservado a -80°C en glicerol 100%. La placa sembrada se incubó por 24 horas a 37°C en condiciones de microaerofilia. Una vez obtenidas colonias de *S. mutans* se realizó un análisis micro y macromorfológico para constatar la pureza del cultivo y la compatibilidad macromorfológica con colonias de *S. mutans*. Estas colonias se resembraron en caldo BHI estéril y se incubaron a 37°C en condiciones de microaerofilia por 48 horas. Esta preparación corresponde al inóculo bacteriano.

Transcurridas 48 horas el inóculo bacteriano fue ajustado mediante espectrofotometría a 0,5 McFarland, a través de la adición de nuevo caldo BHI estéril hasta lograr una absorbancia de 0,125 a 600 nm de longitud de onda.

En placas de polietileno para cultivo celular de 12 pocillos fue dispensada la saliva filtrada y ubicados los bloques de esmalte con su armazón, tras esto fueron llevados a la incubadora a 37°C por 30 minutos y agitados manualmente cada 3 minutos, para la formación de película salival adquirida

En paralelo, en un frasco estéril se realizó una preparación conteniendo:

- 125,75 mL de caldo BHI con glucosa 0,1 mM.
- 14,38 mL de sacarosa 10%.
- 6,88 mL de suspensión de *S. mutans* ajustada a 0,5 McFarland.

Esta preparación fue dispensada en 3 placas de cultivo, usando 10 pocillos por placa, distribuidos según el tratamiento desmineralizador que recibirían, siendo P1 el grupo control negativo, P2 el control positivo y P3 el grupo experimental probiótico. Se dispensaron 4 mL por pocillo y posteriormente se ubicaron los bloques de esmalte previamente tratados con la saliva filtrada para la formación de la biopelícula de *S. mutans*. Posteriormente las placas fueron incubadas en condiciones de microaerofilia por 36 horas a 37°C .

7.8 Proceso de desmineralización.

Los grupos control positivo y experimental probiótico (P2 y P3, respectivamente) fueron expuestos a un tratamiento desmineralizador consistente en la inmersión en sacarosa 10% durante 5 minutos 4 veces al día por 5 días, con el objetivo de lograr una zona de desmineralización compatible con una lesión de caries dental no cavitada. Adicionalmente, el grupo experimental fue tratado con probióticos LGG mediante instilación durante la primera inmersión del día. Por su parte, el grupo control negativo (P1) sólo recibió la renovación del caldo BHI con glucosa 0,1 mM. Todos estos procedimientos fueron siempre realizados en campana de flujo laminar.

Al iniciar el primer día de exposición se dispensó 4 mL de caldo BHI con glucosa 0,1 mM estéril en los pocillos de nuevas placas de cultivo celular para P1, P2 y P3. Las muestras fueron traspasadas a estos nuevos pocillos con medio de cultivo fresco previo a la exposición a sacarosa 10% con la finalidad de mantener cepas bacterianas activas. Luego, se dispensaron 4mL de sacarosa 10% estéril en los pocillos de una nueva placa de cultivo estéril (PSac) y también se dispensaron 4 mL de NaCl 0,9% estéril en los pocillos de otra placa de cultivo estéril (PSu). Además, en un frasco estéril se preparó el probiótico LGG, diluyendo el sobre de liofilizado en 200 mL de suero fisiológico estéril.

Para las muestras de P2 la exposición se realizó sumergiendo cada bloque durante 5 minutos en sacarosa 10% en su pocillo correspondiente en PSac (Figura 5). Transcurridos los 5 minutos cada muestra fue lavada mediante 3 inmersiones en suero fisiológico dispensado en PSu y posteriormente fue devuelta a su pocillo correspondiente en P2 (Figura 5). Para las muestras de P3 el tratamiento desmineralizador se realizó igual hasta el lavado con suero fisiológico, posterior al lavado cada muestra fue expuesta a probiótico LGG mediante la instilación de 10 gotas en la superficie del esmalte durante la primera exposición del día (Figura 6).

El procedimiento de exposición a sacarosa 10% y posterior lavado se realizó 4 veces por día durante 5 días en horarios preestablecidos (Figura 7). Terminada

cada exposición las tres placas eran incubadas en ambiente microaerófilo hasta la siguiente exposición.

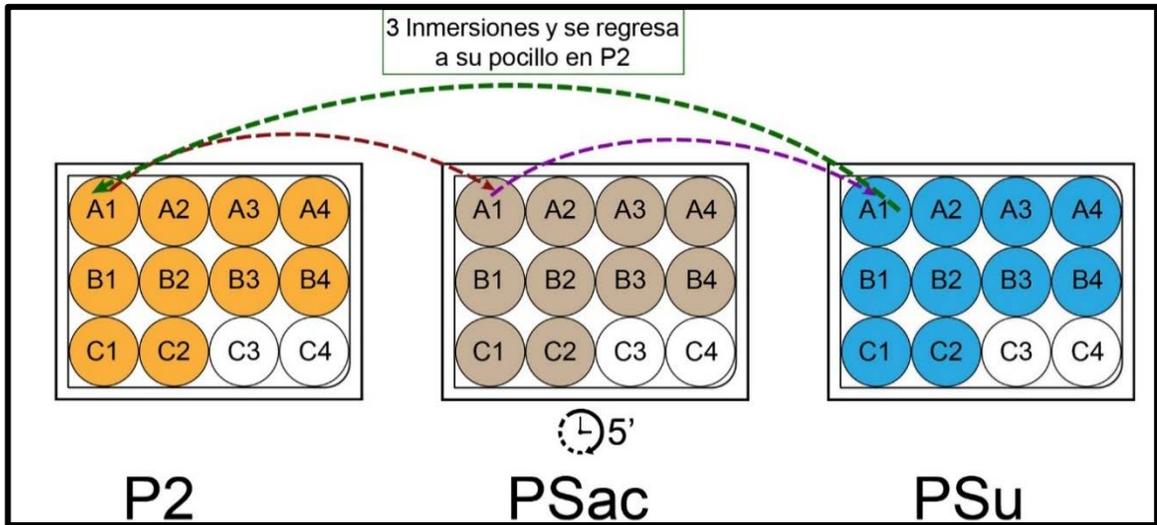


Figura 5. Esquema de exposición de las muestras del control positivo (P2).

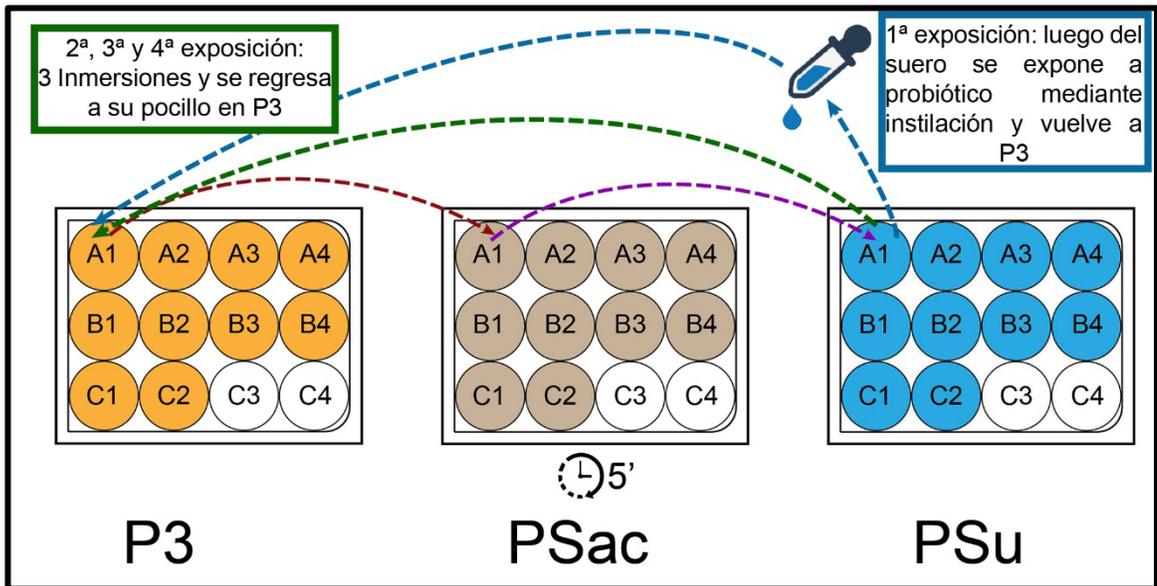


Figura 6. Esquema de exposición de las muestras del grupo experimental probiótico (P3).

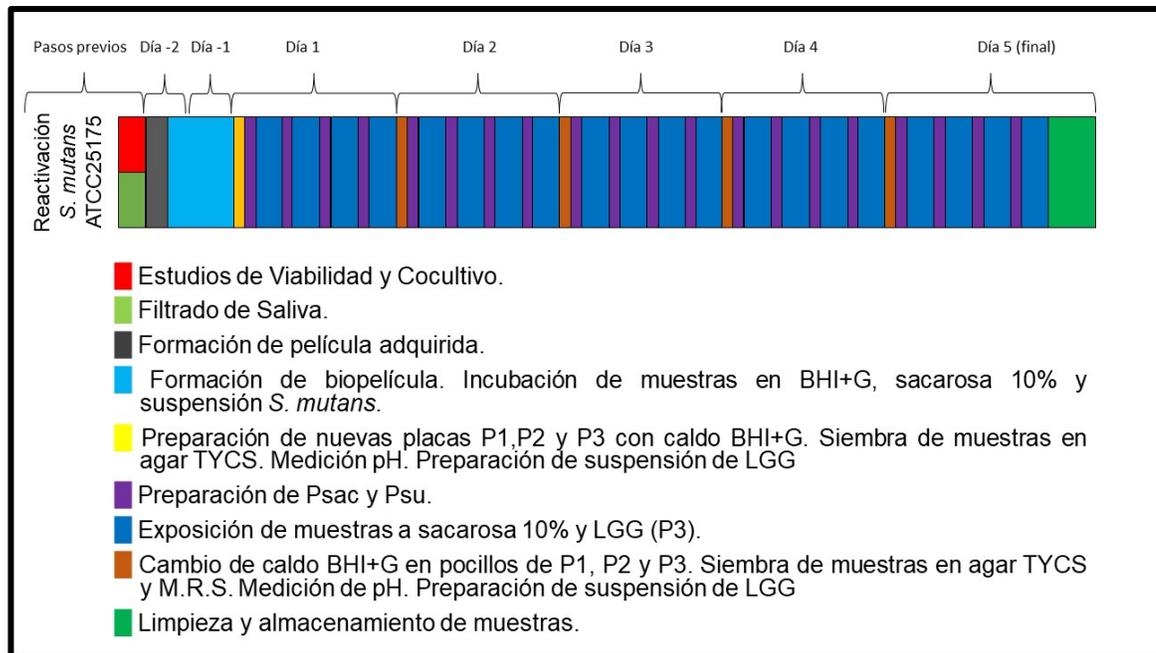


Figura 7. Esquema resumen del protocolo experimental para la formación de biopelícula y tratamiento desmineralizador de las muestras.

7.9 Análisis de viabilidad y pureza de los cultivos.

Para corroborar la viabilidad de los inóculos bacterianos en cada pocillo se realizaron controles microbiológicos, sembrando en placas de agar TYCS previo a la primera exposición; además, este procedimiento fue realizado al finalizar el quinto día, previo al desmontaje del modelo. A partir del segundo día y sólo para P3 se incorporó la siembra en agar MRS siguiendo la metodología previamente descrita, para constatar no solamente la viabilidad de *S. mutans* mediante el cultivo en agar TYCS, sino también la del probiótico LGG en agar MRS. Todas estas siembras fueron incubadas por 24 horas en microaerofilia.

Para el análisis de la pureza de los cultivos se realizó análisis macromorfológico de las colonias sembradas usando la lupa estereoscópica, mientras que para el análisis micromorfológico se realizaron tinciones Gram de frotis obtenido directamente del caldo de un pocillo aleatorio cada una de las placas de cultivo celular y fueron observadas al microscopio Axiostar Plus (ZEISS®, Alemania). También se realizó tinción Gram de frotis obtenido de una colonia de

aquellas crecidas en agar TYCS obtenidas a partir de la siembra del caldo de cada uno de los pocillos.

7.10 Acidogenicidad de la biopelícula.

Cada mañana se realizó la medición del pH del caldo BHI+G que sería desechado para P1, P2 y P3. Esta medición se realizó utilizando el pHmetro de sobremesa Orion Star™ A211 (Thermo Scientific™) en el caldo que había sido extraído desde cada una de las placas de cultivo celular.

7.11 Remoción de la biopelícula y almacenamiento de las muestras

Una vez terminado el proceso de desmineralización, al fin del quinto día, las muestras fueron lavadas usando cepillo de dientes suave, clorhexidina 0,12% y agua destilada estéril. Una vez limpias las muestras, fueron retiradas de su armazón metálico y almacenadas en tubos de microcentrífuga de 2 mL con agua destilada estéril, rotuladas y almacenadas hasta el momento de realizar las mediciones de microdureza (Figura 8).

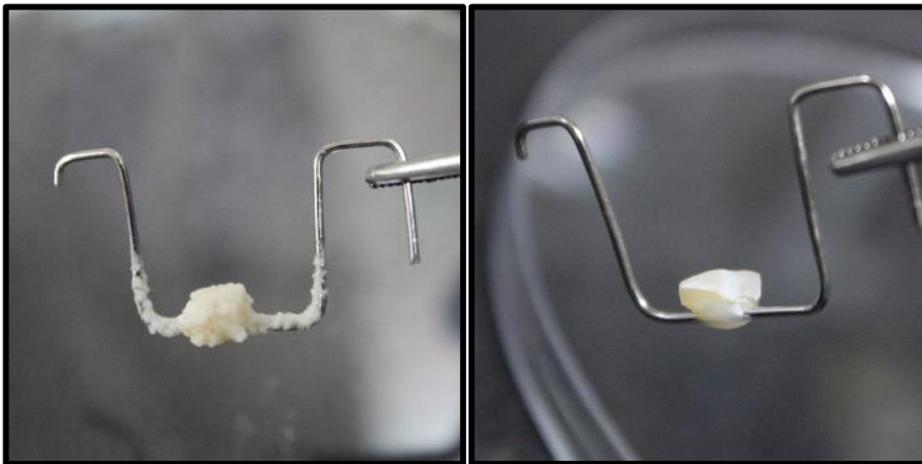


Figura 8. Bloque de esmalte previo y posterior a la remoción de la biopelícula.

7.12 Medición de microdureza superficial

La medición de microdureza superficial de Vickers fue realizada utilizando el durómetro Duramin (Struers, EE. UU.) en el Laboratorio de Metalografía y Microdureza del Departamento de Ingeniería Química, Biotecnología y Materiales

de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile (Figura 9).

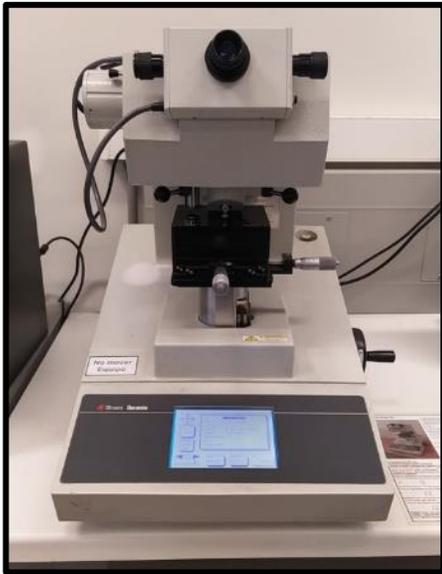


Figura 9. Microinductor Duramin de Struers (EE. UU.).

Se realizaron 3 indentaciones en el bloque de esmalte empleando una carga de 1,96 N durante 15 segundos. Una vez realizada la indentación se utilizó el microscopio del microdurómetro para determinar las dimensiones de las diagonales del rombo obtenido (Figura 10), determinada la medida de ambas diagonales se obtuvo el valor de HV por cada indentación, el cual fue registrado en una hoja de cálculo de Microsoft® Excel® y posteriormente se realizó el cálculo de un promedio de los tres valores obtenidos.



Figura 10. Imagen de la superficie previo y posterior a la indentación.

7.13 Análisis estadístico de valores de dureza superficial.

Los valores promedios obtenidos por la prueba de microdureza superficial fueron registrados en hojas de cálculo utilizando el programa Microsoft® Excel® y usando el mismo programa se realizó el cálculo del promedio y la desviación estándar de los valores promedio obtenidos para cada grupo de exposición. Posteriormente fueron procesados utilizando el programa STATA para el análisis estadístico de los datos, en el cual se le aplicó al total de la muestra la prueba de Shapiro-Wilk para corroborar que los datos siguieran una distribución normal. Una vez comprobada la normalidad de los datos se realizó una prueba de Análisis de la Varianza ANOVA para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados, posteriormente se utilizó una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para determinar entre qué grupos específicos se presentó una diferencia estadísticamente significativa.

8. RESULTADOS

8.1 Estudios de viabilidad y cocultivo *L. rhamnosus* GG y *S. mutans*.

Las pruebas de viabilidad del probiótico LGG fueron positivas, ya que la siembra en agar MRS generó un crecimiento en césped (Figura 11) cuyo análisis morfológico macro y microscópico resultaron compatibles con LGG (Figura 12).



Figura 11. Crecimiento en césped de LGG en agar MRS. Fotografía de las placas transcurridas 24 horas desde la siembra de 100 μ L de suspensión probiótica en agar MRS.

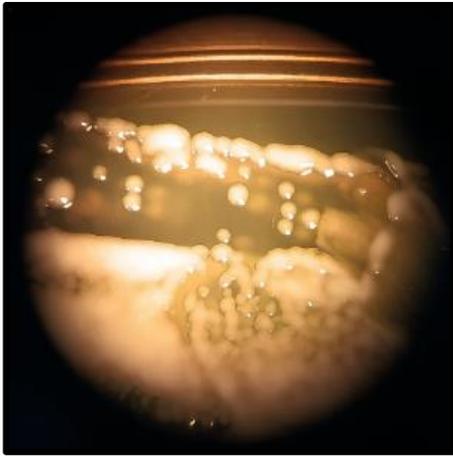


Figura 12. Colonias de LGG observadas en lupa estereoscópica.

Tras los estudios de cocultivo se demostró que una vez inoculados simultáneamente en caldo BHI estéril en igualdad de condiciones de turbidez, ambas especies bacterianas, *S. mutans* ATCC 25175 y *L. rhamnosus* GG eran capaces de coexistir, pudiendo posteriormente crecer ambas en sus respectivos medios selectivos luego de su incubación en conjunto como se puede apreciar en las figuras 13 y 14.

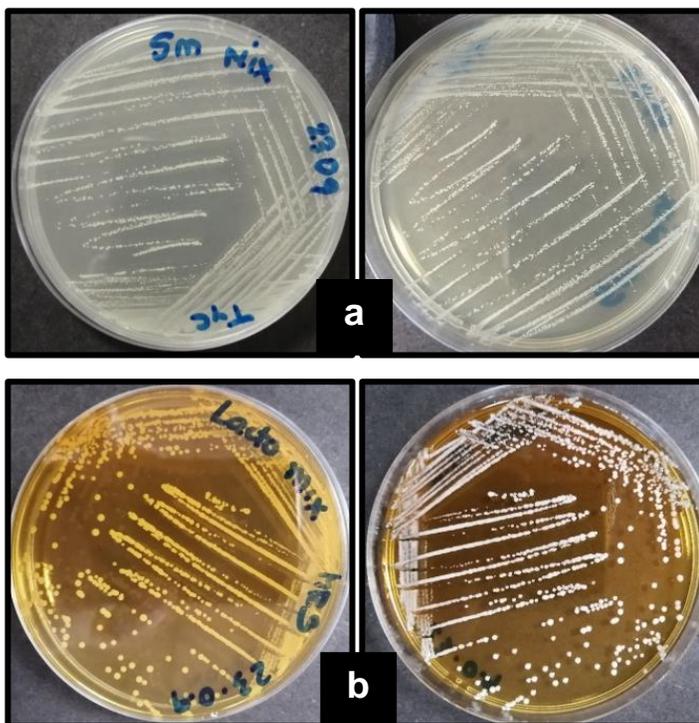


Figura 13. Colonias de *S. mutans* y LGG en agar posterior a incubación conjunta en caldo BHI. a) Colonias de *S. mutans* en agar TYCS. b) Colonias de LGG en agar MRS.

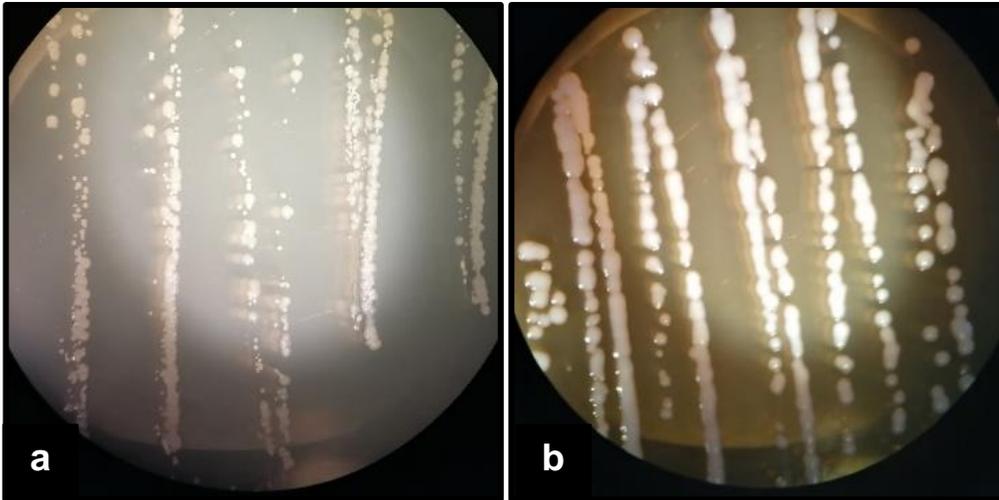


Figura 14. Colonias de estudios de cocultivo observadas en lupa estereoscópica.
 a) Colonias de *S. mutans* en agar TYCS. b) Colonias de LGG en agar MRS.

8.2 Formación de la biopelícula en los bloques de esmalte.

Mediante inspección visual se constató la formación de una placa blanquecina de aspecto rugoso en la superficie de los bloques de esmalte transcurridas 36 horas de la inoculación de *S. mutans* en las placas de cultivo. Con el paso de los días dicha placa se fue extendiendo, abarcando también la superficie del alambre inmersa en el caldo BHI+G (Figura 15).

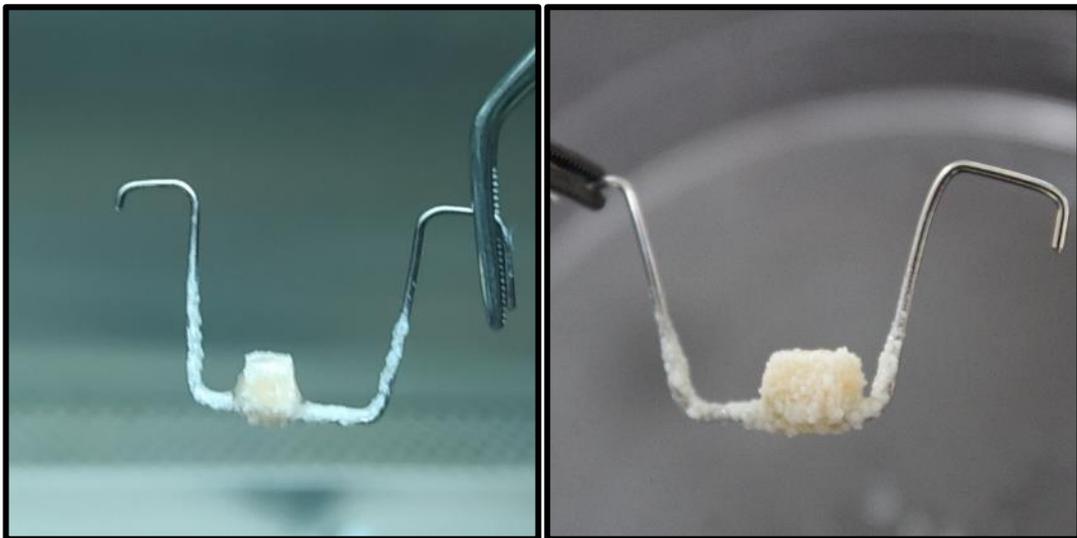


Figura 15. Biopelícula de *S. mutans* en los bloques de esmalte y alambres.

Además, se pudo observar crecimiento bacteriano, mediante un evidente aumento en la turbidez de los caldos de los pocillos a medida que pasaban los días, pudiendo evidenciar depósitos de *S. mutans* en el fondo de los pocillos de la placa de cultivo, así como LGG en suspensión en los pocillos del grupo experimental probiótico P3 (Figuras 16).

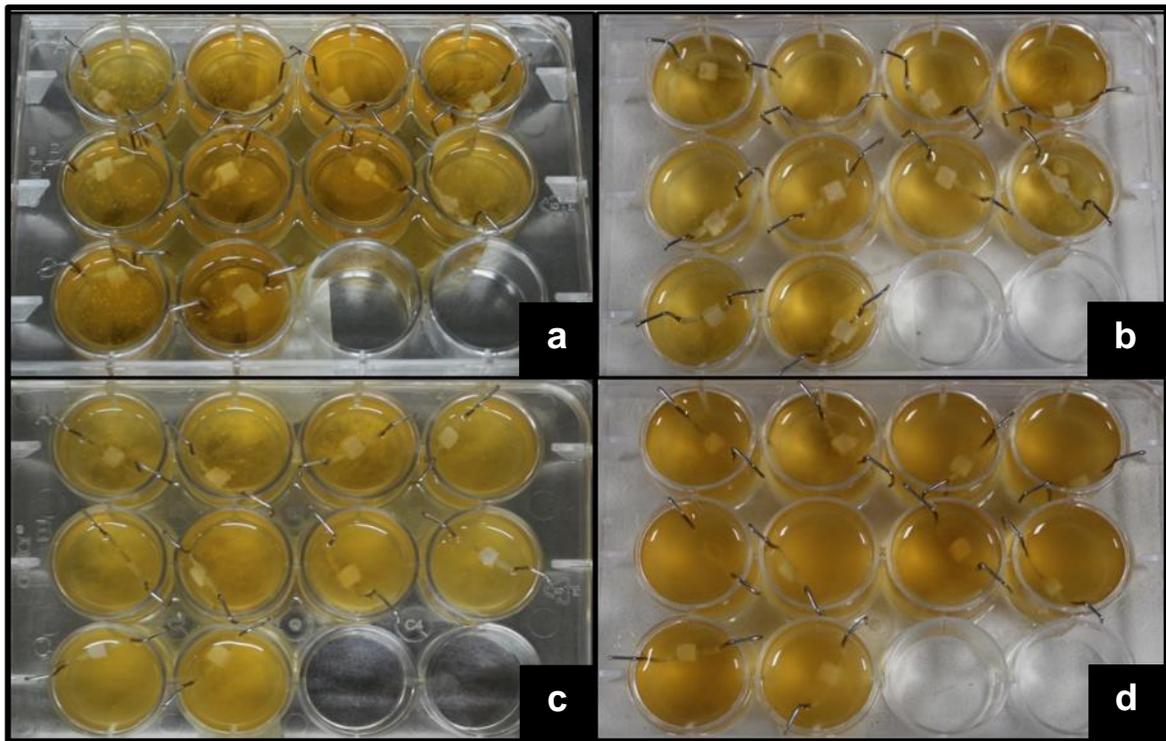


Figura 16. Placas de cultivo con crecimiento bacteriano. a) Placa 2 (P2) en el segundo día de exposición. b) P2 al quinto día de exposición, se observa mayor turbidez en los caldos. c) Placa 3 (P3) al segundo día de exposición, se observa mayor turbidez por LGG en suspensión. d) P3 al quinto día de exposición, se evidencia una mayor turbiedad.

8.3 Análisis de viabilidad y pureza de los cultivos.

Las pruebas de viabilidad y pureza de los cultivos fueron positivas para todos los caldos. El primer control, transcurridas 36 horas posterior a la inoculación, mostró un leve crecimiento bacteriano tras su incubación por 24 horas en ambiente microaerófilo (Figura 17a). Sin embargo, los días siguientes, una vez iniciadas las exposiciones periódicas a sacarosa 10% se pudo evidenciar un mayor crecimiento bacteriano en el agar (Figura 17b).

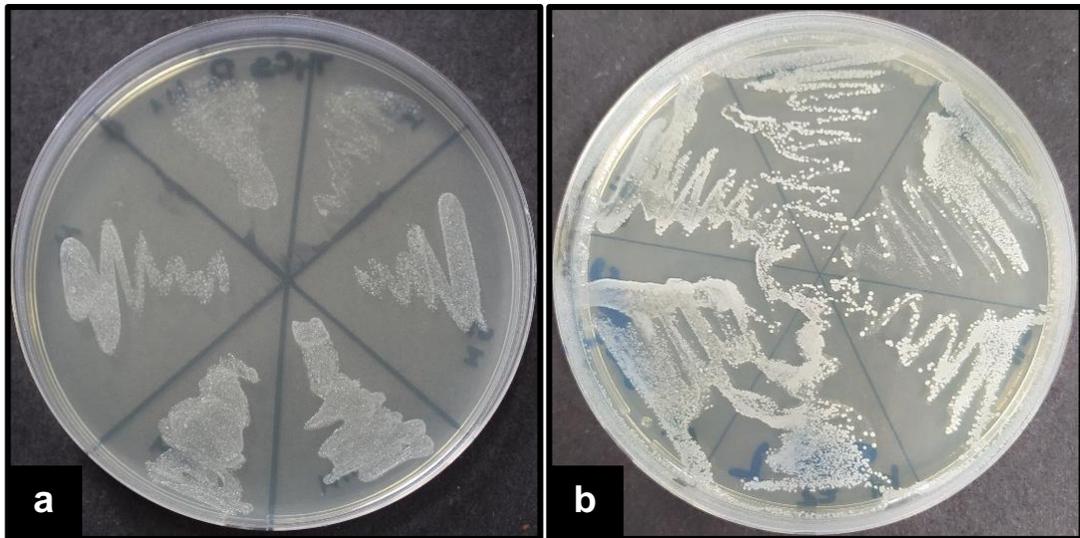


Figura 17. Control de viabilidad de *S. mutans* en caldo BHI+G de los pocillos. a) Primer control a las 36 horas de la inoculación. b) Control a los 5 días.

A partir del segundo control el caldo del grupo experimental probiótico fue sembrado y se pudo observar crecimiento bacteriano de colonias cuya macromorfología resultó compatible con *L. rhamnosus* (Figura 18).



Figura 18. Siembra del caldo BHI+G de los pocillos de P3 en agar MRS.

Al observar al microscopio frotis de los caldos de los pocillos de los grupos controles negativo y positivo se evidenciaron cocáceas Gram positivo agrupadas en cadenas o pares, mientras que en el caldo del grupo experimental probiótico se pudo evidenciar largas cadenas de bacilos Gram positivo además de cocáceas Gram positivo. En el frotis obtenido del cultivo en agar TYCS se pudo evidenciar cocáceas Gram positivo levemente alargadas agrupadas en cadenas o pares (Figura 19).

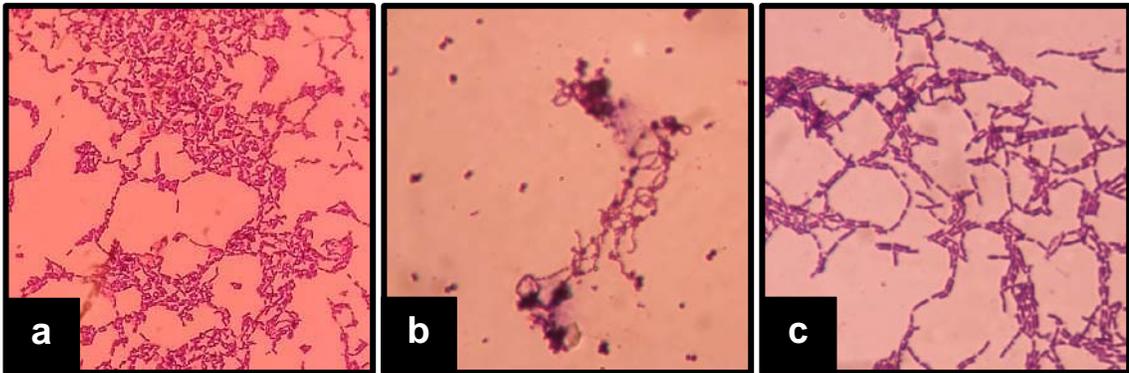


Figura 19. Imágenes de microscopía aumento de 100X. a) Frotis obtenido de una colonia crecida en agar TYCS a partir de la siembra del caldo BHI+G de los pocillos el día 1. b) Frotis obtenido directamente del caldo de un pocillo al azar del grupo control positivo (P2). c) Frotis obtenido directamente del caldo de un pocillo al azar del grupo experimental (P3), en el que se pueden observar largas cadenas de *bacilli* Gram positivo.

8.4 Mediciones de pH.

El pH promedio de las muestras del control negativo fue de 5,2, para las muestras del control positivo fue de 4,76, y para las muestras del grupo experimental probiótico fue de 4,76, valores en detalle se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Promedios de pH de las placas de cultivo.

	pH día 1	pH día 2	pH día 3	pH día 4	pH día 5	Promedio final
P1 (Control negativo)	4,2	5,2	5,2	5,4	6,0	5,2 ±0,64
P2 (Control positivo)	4,3	5,0	4,9	4,7	4,9	4,76 ±0,28
P3 (LGG)	4,2	5,0	4,9	4,8	4,9	4,76 ±0,32

Promedio final ± desviación estándar

8.5 Resultados de pruebas de microdureza de Vickers.

Los valores obtenidos en el ensayo de microdureza superficial de Vickers fueron de 192,6 HV para el grupo control negativo, 128,4 HV para el control positivo, 151 HV para el grupo experimental probiótico. Los valores detallados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2: Valores de microdureza superficial.

	Cantidad de muestras	Promedio (\bar{x})	Desviación Estándar (σ)
Control negativo	10	192,6 HV	26,545 HV
Control positivo	10	128,4 HV	16,286 HV
Probiótico LGG.	10	151,1 HV	21,399 HV

HV: Unidades de Vickers

El resultado de la prueba de Shapiro – Wilk en el software STATA determinó que la muestra presentó una distribución normal, posteriormente el resultado del análisis de la varianza ANOVA demostró que entre los grupos si se presentaba una diferencia estadísticamente significativa. Finalmente, a través de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni se obtuvo que al comparar el grupo control negativo tanto con el control positivo como con el grupo experimental se presentaban diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$), sin embargo, al comparar el grupo control positivo con el grupo experimental probiótico la diferencia no era estadísticamente significativa ($p = 0,083$) (Figura 20).

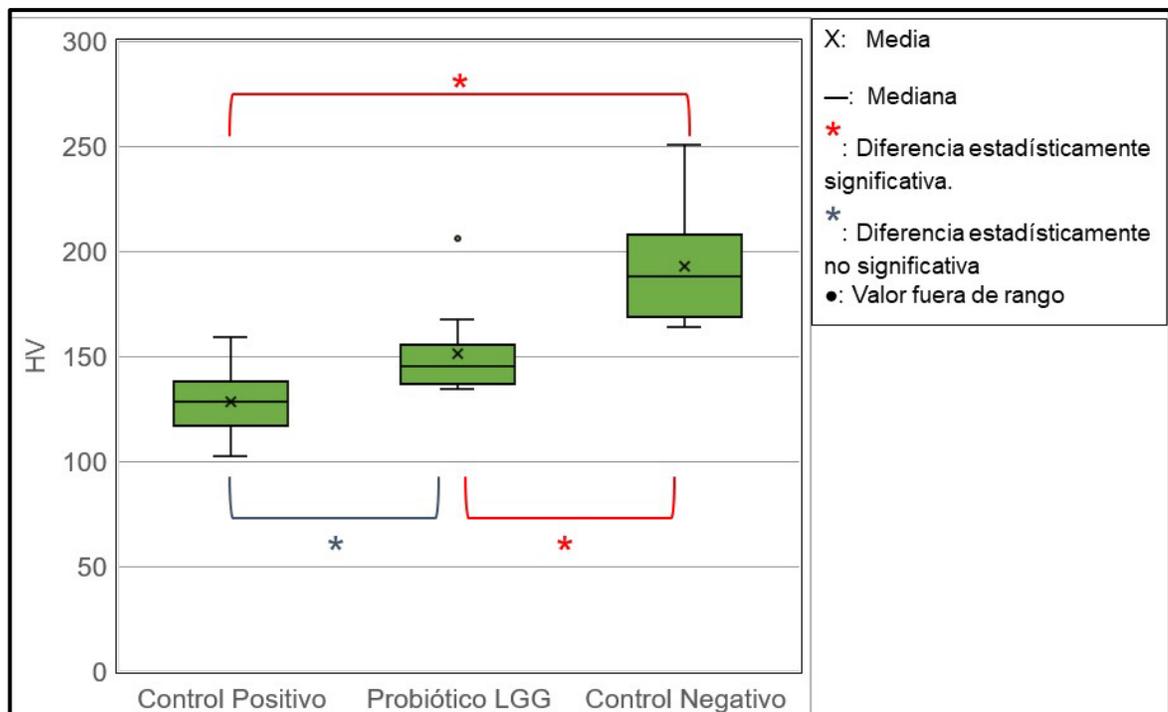


Figura 20. Gráfico con valores de microdureza superficial de Vickers para los tres grupos. Las cajas y bigotes abarcan el rango completo de los valores promedio obtenidos por cada bloque. Se observa la relación estadística entre los grupos.

9. DISCUSIÓN

En este estudio se buscó determinar el efecto del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG sobre la formación de lesiones de caries. Para esto se realizó un modelo de caries *in vitro* mono especie de *S. mutans* sobre bloques de esmalte humano que permitió desmineralizar la superficie del esmalte, el cual fue expuesto periódicamente a sacarosa y, en caso del grupo experimental, a probiótico LGG.

Para la investigación se utilizó el probiótico comercial Vivera® debido a que su formulación contempla únicamente *L. rhamnosus* GG y maltodextrina, a modo de preservante. Además, es un producto comercial de fácil acceso, que se encuentra disponible en el mercado para el consumo inmediato, y está aprobado por las instituciones regulatorias pertinentes, lo que facilita su indicación por parte del odontólogo para la prevención o tratamiento de lesiones de caries. En los experimentos de viabilidad y cocultivo, se demostró que LGG se encuentra viable en el liofilizado, evidenciado por el gran número de unidades formadoras de colonias de LGG crecidas en el medio de cultivo, así como también la capacidad de coexistir con *S. mutans*.

En este estudio la microdureza superficial de Vickers se utilizó como indicador de desmineralización debido a su ya demostrada correlación con la cantidad de mineral de los tejidos dentarios (Davidson y cols., 1974; Collys y cols., 1992; Tobar, 2022). Al comparar los valores de microdureza superficial de los bloques que fueron expuestos al modelo de desmineralización con aquellos que no se expusieron, se pudo obtener una medición cuantitativa que permitió establecer diferencias entre los distintos grupos.

En el presente estudio se evidenció que la exposición al modelo *in vitro* mono especie de *S. mutans* generó una disminución en los valores de microdureza superficial de los bloques de esmalte expuestos a sacarosa al comparar con los valores de aquellos que no se vieron expuestos a sacarosa. Además, se pudo evidenciar que los bloques de esmalte expuestos a sacarosa en los grupos control

positivo y grupo experimental probiótico presentaron zonas de desmineralización, con cambios en la textura y color de la superficie del esmalte, la cual adquirió un tono blanquecino opaco y poroso, compatible con el código 2 del *International Caries Detection and Assessment System* (ICDAS II) (Gugnani y Pandit, 2011).

Con respecto a la investigación del efecto del probiótico LGG en la formación de lesiones de caries se pudo evidenciar una diferencia en la microdureza superficial de aquellos bloques de esmalte que fueron tratados con probióticos LGG durante la formación de la lesión de caries *in vitro*, cuando se le compara con aquellos que no recibieron el probiótico al ser expuestos a sacarosa, lo que sugiere un efecto protector ante el surgimiento de nuevas lesiones de caries.

En 2014 Schwendicke describió en un estudio *in vitro* de boca artificial que *L. rhamnosus* GG presenta propiedades cariogénicas (Schwendicke y cols., 2014), lo que se contrapone con lo evidenciado en la presente investigación. Por otra parte, los estudios *in situ* realizados por Azán en 2019, Colil en 2019 y por Seguel en 2020, evidenciaron la capacidad de *L. rhamnosus* SP1 de prevenir la formación de lesiones de caries en una línea de investigación convergente en la que se logró comparar los efectos del probiótico *L. rhamnosus* SP1, un clon de LGG, al aplicarlo de forma sistémica y tópica sobre la progresión de lesiones de caries, demostrando una disminución de la progresión de lesiones de caries a través de la evaluación de la microdureza superficial y la densidad mineral mediante MicroCT (Azán, 2019; Colil, 2019; Seguel, 2020).

De igual forma, en el ensayo clínico de Rodríguez y cols. en 2016 se evidenció que al administrar leche suplementada con probióticos *L. rhamnosus* SP1 en una población infantil por 10 meses se redujo significativamente la incidencia de caries en el grupo expuesto al probiótico (Rodríguez y cols., 2016). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Sandoval y cols., quienes en 2021 administraron probióticos *L. rhamnosus* SP1 a infantes durante 10 meses, demostrando que la ingesta regular de probióticos en preescolares de alto riesgo cariogénico disminuye la incidencia de lesiones de caries y la concentración salival de β -defensina humana 3 (h β D-3) (Sandoval y cols., 2021).

Este efecto protector por parte de LGG podría ser explicado a través del efecto de las bacteriocinas Enterocina de clase IIc y Carnocina-CP52, ambas producidas por LGG y que en el estudio realizado por Fan en 2023 han demostrado tener efecto inhibitorio sobre *S. mutans* ATCC 25175 en forma individual y sinérgica (Fan, 2023). Además, la investigación realizada por Tahmourespour en 2019 sugiere que el biosurfactante producido por *L. rhamnosus* posee propiedades antiadhesivas y antiagregantes sobre *S. mutans*, lo que podría disminuir el potencial cariogénico de la biopelícula de *S. mutans* (Tahmourespour y cols., 2019).

Respecto a los valores de pH obtenidos, el descenso inicial del pH en todas las placas se explica producto de la sacarosa utilizada en la formación de la biopelícula y su metabolización por parte de *S. mutans*, en los días posteriores. La placa del control negativo presentó un aumento progresivo en sus valores de pH, acercándose cada vez más al neutro. Los valores de pH entre la placa del control positivo y la placa del grupo experimental probiótico fueron similares entre sí, esto se puede explicar debido a la naturaleza acidófila y acidogénica de LGG (Schwendicke y cols., 2014), sin embargo, no hay investigación concluyente al respecto de la capacidad de LGG de metabolizar la sacarosa, ligando sus propiedades acidogénicas principalmente a su naturaleza como microorganismo fermentador y a su capacidad de generar ácido láctico (Schwendicke y cols., 2014; Segers y Lebeer, 2014; Capurso, 2019).

El uso de modelos de caries *in vitro* de biopelículas constituye una importante herramienta para estudiar los cambios que son capaces de producir las biopelículas bacterianas sobre la superficie mineral del diente (Ccahuana-Vásquez y Cury, 2010; Cavalcanti y cols., 2014; Amaechi y cols., 2019), así como el efecto de distintos agentes en el proceso de desmineralización y en la remineralización de los tejidos duros del diente (Giacaman y cols., 2012; Muñoz-Sandoval y cols., 2012; Fernández y cols., 2016). Se utiliza *S. mutans* como la única especie de este modelo debido a que ya se ha validado como una especie capaz de formar biopelículas sobre el sustrato dentario (Ccahuana-Vásquez y Cury, 2010; Amaechi y cols., 2019) así como su capacidad de utilizar nutrientes característicos de la dieta humana para su propia nutrición, como la sacarosa (Cavalcanti y cols., 2014; Botelho y cols., 2016).

Los resultados de microdureza superficial confirman la capacidad del modelo planteado de captar y reproducir los elementos clave partícipes del proceso de desmineralización de los tejidos orales y la capacidad de generar caries *in vitro* (Ten Cate, 2015). Los datos obtenidos al comparar los grupos control con el grupo experimental probiótico nos permiten establecer este modelo como una herramienta para la investigación futura de otras alternativas de probióticos o simbióticos comerciales y su efecto sobre la formación de lesiones de caries. Sin embargo, aún restan factores que juegan roles importantes que es necesario mejorar en futuros estudios.

Los modelos monoespecie presentan limitaciones debido a su incapacidad de reproducir las complejas interacciones que se presentan entre la amplia variedad de bacterias que componen la biopelícula dental (Cavalcanti y cols., 2014; Fernández y cols., 2016).

Por otra parte, aunque los datos obtenidos al comparar el grupo control positivo con el grupo experimental no fueron datos estadísticamente significativos, el valor obtenido ($p=0,083$) en la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni es un valor que se acerca al riesgo alfa definido ($p<0,05$), por lo que se sugiere que un mayor tamaño muestral podría entregar resultados más concluyentes al respecto.

Además, pese a que la microdureza superficial de Vickers es un indicador de pérdida de la integridad del esmalte, es importante considerar en futuros estudios el uso de otras tecnologías, como la microtomografía computarizada, que permita relacionar de forma objetiva una menor microdureza superficial con la disminución de la densidad mineral del esmalte.

Si bien este estudio entrega un marco de trabajo para el futuro de la investigación del efecto de los probióticos sobre el proceso de desmineralización del esmalte dental, los desafíos a abordar aún son variados, no sólo en la investigación en cuanto a cepas probióticas, simbióticos o preparados multicepas a

utilizar, sino también en lo que respecta al método de administración y el vehículo utilizado para su aplicación.

En el presente estudio se realizó la aplicación del probiótico 1 vez por día mediante instilación directa al bloque de esmalte con biopelícula debido a que Viverra® es un producto liofilizado que requiere preparación con un solvente líquido y aunque mediante instilación sí se generó una exposición viable a LGG, que se pudo comprobar a través de la presencia de bacterias bacilos Gram positivo en suspensión en el caldo BHI+G de los pocillos de la placa 3. La aplicación mediante instilación produce una exposición que dista mucho de aquella generada en la boca por la forma en la que se consumen los probióticos liofilizados, los cuales no son aplicados directamente sobre los dientes, sino que tienen un paso más bien transitorio por la cavidad oral. Es por esto, que para futuros estudios *in vitro* deben ser evaluadas otras vías de exposición de los bloques de esmalte al probiótico, como la inmersión de los bloques directamente en la preparación del probiótico, la cual simularía de mejor forma el mecanismo a través del cual los probióticos entran en contacto con los dientes en la ingesta real.

El efecto del probiótico LGG demostrado en este estudio establece una importante línea de investigación en miras a determinar nuevas alternativas terapéuticas de la enfermedad de caries, basadas en el control biológico de las biopelículas de *S. mutans*, con mecanismos de acción dirigida y que no alteren de forma negativa el microbioma oral.

10. CONCLUSIONES

Los bloques de esmalte tratados con probióticos *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG en un modelo de caries *in vitro* monoespecie de *S. mutans* presentan una mayor dureza superficial al ser comparados con los aquellos que no recibieron tratamiento probiótico.

Los resultados de microdureza superficial obtenidos en los distintos grupos establecen que el modelo de caries *in vitro* de biopelícula monoespecie de *S. mutans* es una herramienta válida para la investigación de los procesos de

desmineralización superficial del esmalte, así como también para la experimentación utilizando probióticos.

El efecto del probiótico LGG demostrado en este estudio establece una importante línea de investigación en miras a determinar nuevas alternativas terapéuticas de la enfermedad de caries, basadas en el control biológico de las biopelículas de *S. mutans*, con mecanismos de acción dirigida y que no alteren de forma negativa el microbioma oral.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aliaga, J. (2020). *Efecto del uso del probiótico Lactobacillus rhamnosus SP1 de forma tópica y sistémica en la progresión de lesiones de caries de esmalte, en un modelo in situ en la cavidad oral*. Universidad de Chile.
- Amaechi, B. T., Tenuta, L. M. A., Ricomini Filho, A. P., y Cury, J. A. (2019). *Protocols to Study Dental Caries In Vitro: Microbial Caries Models* (pp. 357–368). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9012-2_32
- An, J., Kim, H., y Yang, K. M. (2020). An Aqueous Extract of a Bifidobacterium Species Induces Apoptosis and Inhibits Invasiveness of Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(6), 885–893. <https://doi.org/10.4014/jmb.1912.12054>
- Askeland, D. R., y Wright, W. J. (2016). Dureza de los materiales. En *Ciencia e ingeniería de materiales 7ª edición* (7ª edición, pp. 202–203). Cengage Learning.
- Azán, N. (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* (R. Cabello Ibacache & P. L. Palma Fluxá, Eds.).
- Baba, N., Samson, S., Bourdet-Sicard, R., Rubio, M., y Sarfati, M. (2008). Commensal bacteria trigger a full dendritic cell maturation program that promotes the expansion of non-Tr1 suppressor T cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(2), 468–476. <https://doi.org/10.1189/jlb.0108017>
- Bizzini, B., Pizzo, G., Scapagnini, G., Nuzzo, D., y Vasto, S. (2012). Probiotics and Oral Health. *Current Pharmaceutical Design*, 18(34), 5522–5531. <https://doi.org/10.2174/138161212803307473>
- Botelho, J. N., Villegas-Salinas, M., Troncoso-Gajardo, P., Giacaman, R. A., y Cury, J. A. (2016). Enamel and dentine demineralization by a combination of starch

- and sucrose in a biofilm – caries model. *Brazilian Oral Research*, 30(1).
<https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0052>
- Bowden, G. H. (1995). The Role of Microbiology in Models of Dental Caries: Reaction Paper. *Advances in Dental Research*, 9(3), 255–269.
<https://doi.org/10.1177/08959374950090031001>
- Brubaker, L., y Wolfe, A. J. (2017). The female urinary microbiota, urinary health and common urinary disorders. *Annals of Translational Medicine*, 5, 34–34.
<https://doi.org/10.21037/atm.2016.11.62>
- Budden, K. F., Gellatly, S. L., Vaughan, A., Amorim, N., Horvat, J. C., y cols. (2022). Probiotic *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* Protects against Cigarette Smoke-Induced Inflammation in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 252. <https://doi.org/10.3390/ijms24010252>
- Cagetti, M., Mastroberardino, S., Milia, E., Cocco, F., Lingström, P., y cols. (2013). The Use of Probiotic Strains in Caries Prevention: A Systematic Review. *Nutrients*, 5(7), 2530–2550. <https://doi.org/10.3390/nu5072530>
- Callister, W. D. , Jr., y Rethwisch, W. G. (2018). Hardness. En *Materials science and engineering, an introduction*. (10ª edición, pp. 165–171). John Wiley & Sons, Inc.
- Capurso, L. (2019). Thirty Years of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 53(Supplement 1), S1–S41.
<https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001170>
- Cavalcanti, Y. W., Bertolini, M. M., da Silva, W. J., Del-Bel-Cury, A. A., Tenuta, L. M. A., y cols. (2014). A three-species biofilm model for the evaluation of enamel and dentin demineralization. *Biofouling*, 30(5), 579–588.
<https://doi.org/10.1080/08927014.2014.905547>
- Ccahuana-Vásquez, R. A., y Cury, J. A. (2010). *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Brazilian Oral*

Research, 24(2), 135–141. <https://doi.org/10.1590/S1806-83242010000200002>

Christensen, G. J. M., y Brüggemann, H. (2014). Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Beneficial Microbes*, 5(2), 201–215. <https://doi.org/10.3920/BM2012.0062>

Colil, M. Paz. (2019). *Efecto del uso de tópico del probiótico Lactobacillus rhamnosus SP1 en un modelo de caries in situ* (G. Rodríguez Martínez & R. Cabello Ibacache, Eds.).

Collys, K., Slop, D., Cleymaet, R., Coomans, D., y Michotte, Y. (1992). Load dependency and reliability of microhardness measurements on acid-etched enamel surfaces. *Dental Materials*, 8(5), 332–335. [https://doi.org/10.1016/0109-5641\(92\)90110-X](https://doi.org/10.1016/0109-5641(92)90110-X)

Coqueiro, A. Y., Bonvini, A., Raizel, R., Tirapegui, J., y Rogero, M. M. (2018). Probiotic supplementation in dental caries: is it possible to replace conventional treatment? *Nutrire*, 43(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s41110-018-0064-3>

Dai, M., Li, Y., Xu, L., Wu, D., Zhou, Q., y cols. (2021). A Novel Bacteriocin From *Lactobacillus Pentosus* ZFM94 and Its Antibacterial Mode of Action. *Frontiers in Nutrition*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.710862>

Davidson, C. L., Hoekstra, I. S., y Arends, J. (1974). Microhardness of Sound, Decalcified and Etched Tooth Enamel Related to the Calcium Content. *Caries Research*, 8(2), 135–144. <https://doi.org/10.1159/000260101>

Eslami, M., Bahar, A., Keikha, M., Karbalaei, M., Kobylak, N. M., y cols. (2020). Probiotics function and modulation of the immune system in allergic diseases. *Allergologia et Immunopathologia*, 48(6), 771–788. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2020.04.005>

Eslami, M., Yousefi, B., Kokhaei, P., Hemati, M., Nejad, Z. R., y cols. (2019). Importance of probiotics in the prevention and treatment of colorectal cancer.

Journal of Cellular Physiology, 234(10), 17127–17143.
<https://doi.org/10.1002/jcp.28473>

Fan, W.-H. (2023). *Obtención y caracterización de bacteriocinas aisladas de Lacticaseibacillus rhamnosus GG y efecto sobre el patobionte cariogénico Streptococcus mutans ATCC 25175*. Universidad de Chile.

Fathizadeh, H., Pakdel, F., Saffari, M., Esmaeili, D., Heravi, M. M., y cols. (2022). Bacteriocins: Recent Advances in its Application as an Antimicrobial Alternative. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 23(8), 1028–1040.
<https://doi.org/10.2174/1389201022666210907121254>

Fernández, C. E., Tenuta, L. M. A., y Cury, J. A. (2016). Validation of a Cariogenic Biofilm Model to Evaluate the Effect of Fluoride on Enamel and Root Dentine Demineralization. *PLOS ONE*, 11(1), e0146478.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146478>

Fierro-Monti, C., Aguayo-Saldías, C., Lillo-Climent, F., y Riveros-Figueroa, F. (2017). Rol de los Probióticos como Bacterioterapia en Odontología. Revisión de la Literatura. *Odontoestomatología*, 19(30), 4–13.
<https://doi.org/10.22592/ode2017n30a2>

Food and Agriculture Organization of the United Nations., y World Health Organization. (2006). *Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Frencken, J. E. (2017). Atraumatic restorative treatment and minimal intervention dentistry. *British Dental Journal*, 223(3), 183–189.
<https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2017.664>

Giacaman, R. A., Muñoz, M. J., Ccahuana-Vasquez, R. A., Muñoz-Sandoval, C., y Cury, J. A. (2012). Effect of Fluoridated Milk on Enamel and Root Dentin

Demineralization Evaluated by a Biofilm Caries Model. *Caries Research*, 46(5), 460–466. <https://doi.org/10.1159/000339428>

Glenn, F. B., y Glenn, W. D. (1994). Use of chemotherapeutic agents for caries prevention. *Journal of Dental Research*, 73(7), 1236–1236. <https://doi.org/10.1177/00220345940730070201>

Gugnani, N., y Pandit, I. (2011). International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): A New Concept. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 4(2), 93–100. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-1089>

Hasslöf, P., y Stecksén-Blicks, C. (2020). *Chapter 10: Probiotic Bacteria and Dental Caries* (pp. 99–107). <https://doi.org/10.1159/000455377>

Hidalgo-Cantabrana, C., Delgado, S., Ruiz, L., Ruas-Madiedo, P., Sánchez, B., y cols. (2017). Bifidobacteria and Their Health-Promoting Effects. *Microbiology Spectrum*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAD-0010-2016>

Hoffmann, A., y Daniels, R. (2017). Lactobacilli for the Treatment of Oral Diseases. *Journal of Probiotics & Health*, 05(03). <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000181>

James, S. L., Abate, D., Abate, K. H., Abay, S. M., Abbafati, C., y cols. (2018). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 392(10159), 1789–1858. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32279-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32279-7)

Jara, M. (2017). *Efecto remineralizante de un agente a base de fluor y grafeno, sobre bloques de esmalte desmineralizados con un modelo de biopelícula de Streptococcus mutans* (M. Díaz Dosque, R. Cabello Ibacache, & P. L. Palma Fluxá, Eds.).

- Kilian, M., Chapple, I. L. C., Hannig, M., Marsh, P. D., Meuric, V., y cols. (2016). The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. *British Dental Journal*, 221(10), 657–666. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2016.865>
- Kumar, P. S., y Mason, M. R. (2015). Mouthguards: does the indigenous microbiome play a role in maintaining oral health? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00035>
- Laleman, I., Detailleur, V., Slot, D. E., Slomka, V., Quirynen, M., y cols. (2014). Probiotics reduce mutans streptococci counts in humans: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Investigations*, 18(6), 1539–1552. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1228-z>
- Lee, N.-K., Kim, W.-S., y Paik, H.-D. (2019). Bacillus strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food Science and Biotechnology*, 28(5), 1297–1305. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00691-9>
- Lim, H. J., y Shin, H. S. (2020). Antimicrobial and Immunomodulatory Effects of Bifidobacterium Strains: A Review. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(12), 1793–1800. <https://doi.org/10.4014/jmb.2007.07046>
- Lin, T.-H., Lin, C.-H., y Pan, T.-M. (2018). The implication of probiotics in the prevention of dental caries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(2), 577–586. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8664-z>
- Maldonado Galdeano, C., Cazorla, S. I., Lemme Dumit, J. M., Vélez, E., y Perdigón, G. (2019). Beneficial Effects of Probiotic Consumption on the Immune System. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 74(2), 115–124. <https://doi.org/10.1159/000496426>
- Marsh, P. D. (1995). The Role of Microbiology in Models of Dental Caries. *Advances in Dental Research*, 9(3), 244–254. <https://doi.org/10.1177/08959374950090030901>

- Marsh, P. D. (2018). In Sickness and in Health—What Does the Oral Microbiome Mean to Us? An Ecological Perspective. *Advances in Dental Research*, 29(1), 60–65. <https://doi.org/10.1177/0022034517735295>
- Martinović, A., Cocuzzi, R., Arioli, S., y Mora, D. (2020). Streptococcus thermophilus: To Survive, or Not to Survive the Gastrointestinal Tract, That Is the Question! *Nutrients*, 12(8), 2175. <https://doi.org/10.3390/nu12082175>
- Maske, T. T., van de Sande, F. H., Arthur, R. A., Huysmans, M. C. D. N. J. M., y Cenci, M. S. (2017). In vitro biofilm models to study dental caries: a systematic review. *Biofouling*, 33(8), 661–675. <https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1354248>
- Ministerio de Salud. (2019). *Informe Encuesta Nacional de Salud 2016-2017: Salud Bucal*. <https://goo.gl/oe2iVt>
- Moron, B. M., Comar, L. P., Wiegand, A., Buchalla, W., Yu, H., y cols. (2013). Different Protocols to Produce Artificial Dentine Carious Lesions in vitro and in situ: Hardness and Mineral Content Correlation. *Caries Research*, 47(2), 162–170. <https://doi.org/10.1159/000345362>
- Muñoz-Sandoval, C., Muñoz-Cifuentes, M. J., Giacaman, R. A., Ccahuana-Vasquez, R. A., y Cury, J. A. (2012). Effect of bovine milk on Streptococcus mutans biofilm cariogenic properties and enamel and dentin demineralization. *Pediatric dentistry*, 34(7), e197-201.
- Näse, L., Hatakka, K., Savilahti, E., Saxelin, M., Pönkä, A., y cols. (2001). Effect of Long-Term Consumption of a Probiotic Bacterium, Lactobacillus rhamnosus GG, in Milk on Dental Caries and Caries Risk in Children. *Caries Research*, 35(6), 412–420. <https://doi.org/10.1159/000047484>
- Naveillán, J. (2020). *Efecto del probiótico Lactobacillus rhamnosus SP1 de manera tópica, en la progresión de lesiones de caries de esmalte, en un modelo in situ* (R. Cabello Ibacache, G. Rodríguez Martínez, & M. Díaz Dosque, Eds.).

- O'Mahony, L., McCarthy, J., Kelly, P., Hurley, G., Luo, F., y cols. (2005). Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: Symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology*, 128(3), 541–551. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.11.050>
- Padilla, M. M. (2018). *Efecto remineralizante de distintas concentraciones de un agente a base de fluor y grafeno en bloques de esmalte desmineralizado*. Universidad de Chile.
- Peralta, S. L., de Carvalho, P. H. A., Ccahuana-Vásquez, R. A., de Pereira, C. M. P., Cury, J. A., y cols. (2017). Cytotoxicity, genotoxicity and antibiofilm activity on Streptococcus mutans of an experimental self-etching adhesive system containing natural Butia capitata oil. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 78, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2017.06.011>
- Philip, N., Suneja, B., y Walsh, L. J. (2018). Ecological Approaches to Dental Caries Prevention: Paradigm Shift or Shibboleth? *Caries Research*, 52(1–2), 153–165. <https://doi.org/10.1159/000484985>
- Picard, C., Fioramonti, J., Francois, A., Robinson, T., Neant, F., y cols. (2005). Review article: bifidobacteria as probiotic agents - physiological effects and clinical benefits. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 22(6), 495–512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02615.x>
- Pitts, N. B., Twetman, S., Fisher, J., y Marsh, P. D. (2021). Understanding dental caries as a non-communicable disease. *British Dental Journal*, 231(12), 749–753. <https://doi.org/10.1038/s41415-021-3775-4>
- Poorani, S., Srinivasan, M., y Nivedhitha, M. (2019). Probiotic Streptococcus strains in caries prevention: A systematic review. *Journal of Conservative Dentistry*, 22(2), 123. https://doi.org/10.4103/JCD.JCD_505_18
- Reddy, B. S., y Rivenson, A. (1993). Inhibitory effect of Bifidobacterium longum on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-

methylimidazo[4,5-f]quinoline, a food mutagen. *Cancer research*, 53(17), 3914–3918.

Resta-Lenert, S. (2003). Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut*, 52(7), 988–997. <https://doi.org/10.1136/gut.52.7.988>

Ribeiro, C. C. C., Ccahuana-Vásquez, R. A., Carmo, C. D. S. do, Alves, C. M. C., Leitão, T. J., y cols. (2012). The effect of iron on *Streptococcus mutans* biofilm and on enamel demineralization. *Brazilian Oral Research*, 26(4), 300–305. <https://doi.org/10.1590/S1806-83242012000400003>

Riccia, D. Della, Bizzini, F., Perilli, M., Polimeni, A., Trinchieri, V., y cols. (2007). Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. *Oral Diseases*, 13(4), 376–385. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2006.01291.x>

Rodríguez, G., Ruiz, B., Faleiros, S., Vistoso, A., Marró, M. L., y cols. (2016). Probiotic Compared with Standard Milk for High-caries Children. *Journal of Dental Research*, 95(4), 402–407. <https://doi.org/10.1177/0022034515623935>

Rosier, B. T., De Jager, M., Zaura, E., y Krom, B. P. (2014). Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00092>

Saha, S., Tomaro-Duchesneau, C., Tabrizian, M., y Prakash, S. (2012). Probiotics as oral health biotherapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12(9), 1207–1220. <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.693474>

Sánchez, M. T., Ruiz, M. A., y Morales, M. E. (2015). Microorganismos probióticos y salud. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 56(1), 45–59. <https://doi.org/10.4321/S2340-98942015000100007>

Sanders, M. E. (2008). Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. *Clinical Infectious Diseases*, 46(s2), S58–S61. <https://doi.org/10.1086/523341>

- Sandoval, F., Faleiros, S., Cabello, R., Díaz-Dosque, M., Rodríguez, G., y cols. (2021). The consumption of milk supplemented with probiotics decreases the occurrence of caries and the salivary concentration of hβD-3 in children. *Clinical Oral Investigations*, 25(6), 3823–3830. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03712-8>
- Schwendicke, F. (2019). Less Is More? The Long-Term Health and Cost Consequences Resulting from Minimal Invasive Caries Management. *Dental Clinics of North America*, 63(4), 737–749. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2019.06.006>
- Schwendicke, F., Dörfer, C., Kneist, S., Meyer-Lueckel, H., y Paris, S. (2014). Cariogenic Effects of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in a Dental Biofilm Model. *Caries Research*, 48(3), 186–192. <https://doi.org/10.1159/000355907>
- Schwendicke, F., Eggers, K., Meyer-Lueckel, H., Dörfer, C., Kovalev, A., y cols. (2015). In vitro Induction of Residual Caries Lesions in Dentin: Comparative Mineral Loss and Nano-Hardness Analysis. *Caries Research*, 49(3), 259–265. <https://doi.org/10.1159/000371897>
- Segers, M. E., y Lebeer, S. (2014). Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG--host interactions. *Microbial cell factories*, 13 Suppl 1(Suppl 1), S7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S7>
- Seguel, J. G. (2020). *Efecto del uso tópico/sistémico del probiótico Lactobacillus rhamnosus en la densidad mineral, micropureza superficial y morfología superficial de esmalte en un modelo de caries in situ* (G. Rodríguez Martínez & R. Cabello Ibacache, Eds.).
- Selinger, C. P., Bell, A., Cairns, A., Lockett, M., Sebastian, S., y cols. (2013). Probiotic VSL#3 prevents antibiotic-associated diarrhoea in a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Journal of Hospital Infection*, 84(2), 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2013.02.019>

- Selwitz, R. H., Ismail, A. I., y Pitts, N. B. (2007). Dental caries. *Lancet (London, England)*, 369(9555), 51–59. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60031-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60031-2)
- Shimauchi, H., Mayanagi, G., Nakaya, S., Minamibuchi, M., Ito, Y., y cols. (2008). Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(10), 897–905. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01306.x>
- Simón-Soro, A., y Mira, A. (2015). Solving the etiology of dental caries. *Trends in Microbiology*, 23(2), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.10.010>
- Singh, J., Rivenson, A., Tomita, M., Shimamura, S., Ishibashi, N., y cols. (1997). *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 18(4), 833–841. <https://doi.org/10.1093/carcin/18.4.833>
- Skucha-Nowak, M., Gibas, M., Tanasiewicz, M., Twardawa, H., y Szklarski, T. (2015). Natural and Controlled Demineralization for Study Purposes in Minimally Invasive Dentistry. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 24(5), 891–898. <https://doi.org/10.17219/acem/28903>
- Sønju Clasen, A. B., y Øgaard, B. (1999). Experimental intra-oral caries models in fluoride research. *Acta odontologica Scandinavica*, 57(6), 334–341. <https://doi.org/10.1080/000163599428580>
- Stecksén-Blicks, C., Sjöström, I., y Twetman, S. (2009). Effect of Long-Term Consumption of Milk Supplemented with Probiotic *Lactobacilli* and Fluoride on Dental Caries and General Health in Preschool Children: A Cluster-Randomized Study. *Caries Research*, 43(5), 374–381. <https://doi.org/10.1159/000235581>

- Tahmourespour, A., Kasra-Kermanshahi, R., y Salehi, R. (2019). Lactobacillus rhamnosus biosurfactant inhibits biofilm formation and gene expression of caries-inducing Streptococcus mutans. *Dental research journal*, 16(2), 87–94.
- Tao, R., Jurevic, R. J., Coulton, K. K., Tsutsui, M. T., Roberts, M. C., y cols. (2005). Salivary Antimicrobial Peptide Expression and Dental Caries Experience in Children. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(9), 3883–3888. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.9.3883-3888.2005>
- Ten Cate, J. M. (2015). Models and role models. *Caries research*, 49 Suppl 1, 3–10. <https://doi.org/10.1159/000380870>
- Ten Cate, J. M., y Duijsters, P. P. E. (1982). Alternating Demineralization and Remineralization of Artificial Enamel Lesions. *Caries Research*, 16(3), 201–210. <https://doi.org/10.1159/000260599>
- Teughels, W., Durukan, A., Ozcelik, O., Pauwels, M., Quirynen, M., y cols. (2013). Clinical and microbiological effects of Lactobacillus reuteri probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(11), 1025–1035. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12155>
- Thurnheer, T., y Paqué, P. N. (2021). *Biofilm Models to Study the Etiology and Pathogenesis of Oral Diseases* (pp. 30–37). <https://doi.org/10.1159/000510197>
- Tobar, D. (2022). *Efecto del Lacticaseibacillus rhamnosus sp1 en la progresión de caries en un modelo in situ* (G. Rodríguez Martínez, R. Cabello Ibacache, & M. Díaz Dosque, Eds.).
- Twetman, S. (2018). Prevention of dental caries as a non-communicable disease. *European Journal of Oral Sciences*, 126(S1), 19–25. <https://doi.org/10.1111/eos.12528>

- Twetman, S., y Jørgensen, M. R. (2021). Can probiotic supplements prevent early childhood caries? A systematic review and meta-analysis. *Beneficial Microbes*, 12(3), 231–238. <https://doi.org/10.3920/BM2021.0008>
- Twetman, S., Jørgensen, M. R., y Keller, M. K. (2017). Fifteen Years of Probiotic Therapy in the Dental Context: What Has Been Achieved? *CDA Journal California Dental Association*, 45(10), 539–545.
- Wattanarat, O., Makeudom, A., Sastraruji, T., Piwat, S., Tianviwat, S., y cols. (2015). Enhancement of salivary human neutrophil peptide 1–3 levels by probiotic supplementation. *BMC Oral Health*, 15(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12903-015-0003-0>
- Whorwell, P. J., Altringer, L., Morel, J., Bond, Y., Charbonneau, D., y cols. (2006). Efficacy of an Encapsulated Probiotic *Bifidobacterium infantis* 35624 in Women with Irritable Bowel Syndrome. *The American Journal of Gastroenterology*, 101(7), 1581–1590. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00734.x>
- Yadav, M. K., Kumari, I., Singh, B., Sharma, K. K., y Tiwari, S. K. (2022). Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(2), 505–521. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11646-8>
- Yao, S., Zhao, Z., Wang, W., y Liu, X. (2021). *Bifidobacterium Longum*: Protection against Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Immunology Research*, 2021, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2021/8030297>
- Yu, O. Y., Zhao, I. S., Mei, M. L., Lo, E. C.-M., y Chu, C.-H. (2017). A Review of the Common Models Used in Mechanistic Studies on Demineralization-Remineralization for Cariology Research. *Dentistry Journal*, 5(2), 20. <https://doi.org/10.3390/dj5020020>

- Zaura, E., y Twetman, S. (2019). Critical Appraisal of Oral Pre- and Probiotics for Caries Prevention and Care. *Caries Research*, 53(5), 514–526. <https://doi.org/10.1159/000499037>
- Zero, D. T. (1995). In Situ Caries Models. *Advances in Dental Research*, 9(3), 214–230. <https://doi.org/10.1177/08959374950090030501>
- Zhang, J.-W., Du, P., Yang, B.-R., Gao, J., Fang, W.-J., y cols. (2012). Preoperative Probiotics Decrease Postoperative Infectious Complications of Colorectal Cancer. *The American Journal of the Medical Sciences*, 343(3), 199–205. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e31823aace6>
- Zommiti, M., Chikindas, M. L., y Ferchichi, M. (2020). Probiotics—Live Biotherapeutics: a Story of Success, Limitations, and Future Prospects—Not Only for Humans. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(3), 1266–1289. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09570-5>

12. ANEXOS

Anexo 1: Consentimiento informado donantes 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 biofilm bucal. Modelo *in situ* de caries"

Investigador Principal: Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez

Sede de Estudio: Facultad de Odontología, Universidad de Chile – Sergio Livingstone 943 – 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 aclarar 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 acrílico 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.



Anexo 2: Certificado de inscripción proyecto FonDOR 2022/02.

**CARTA – CERTIFICADO DE INSCRIPCIÓN DE PROYECTO FONDOR**

Santiago, 2 de mayo de 2022

Mat. Asigna Código FONDOR 2022/02.

Dr. GONZALO RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

Investigador Responsable Proyecto FONDOR
 Departamento de Odontología Restauradora
 Facultad de Odontología

PRESENTE

Estimado Dr. Rodríguez:

Informo a usted que con fecha 2 de mayo de 2022, el Proyecto FONDOR titulado: “Efecto del Uso de Probióticos No Lactobacillus en la Microdureza Superficial y Densidad Mineral de Esmalte en un Modelo In Vitro de Caries”, del cual usted es el Investigador Responsable, ha quedado inscrito en la DIFO con el **Código FONDOR 2022/02**, autorizándose su ejecución a partir del 3 de mayo del año en curso.

A partir de la Fecha de Registro del Proyecto, usted debe considerar el período de duración del Proyecto FONDOR de 18 meses, por lo tanto,

Fecha de Entrega Informe Final:	2 de noviembre de 2023.
---------------------------------	-------------------------

Deseándole el mayor de los éxitos tanto a usted como a su Equipo de Colaboradores, se despide cordialmente,


DR. ALFREDO MOLINA BERRÍOS*Director de Investigación**Facultad de Odontología - Universidad de Chile*

AMB/rcm.