



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

**“EFECTO DEL USO DE PROBIÓTICOS COMERCIALES EN LA  
MICRODUREZA SUPERFICIAL DEL ESMALTE EN UN MODELO *IN VITRO* DE  
CARIES”**

**George Ikenna Agunanna**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Dra. Patria Palma Fluxá**

**Dra. Paola Barnafi Retamal**

**Adscrito a Proyecto FONDOR 2022/02**

**Santiago – Chile**

**2024.**





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

**“EFECTO DEL USO DE PROBIÓTICOS COMERCIALES EN LA  
MICRODUREZA SUPERFICIAL DEL ESMALTE EN UN MODELO *IN VITRO* DE  
CARIES”**

**George Ikenna Agunanna**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Dra. Patria Palma Fluxá**

**Dra. Paola Barnafi Retamal**

**Adscrito a Proyecto FONDOR 2022/02**

**Santiago – Chile**

**2024.**

## **i. AGRADECIMIENTOS**

A mis hermanas y a mi hermano por estar a mi lado y darme ánimos durante este proceso, son mi más grande tesoro.

A María Jesús por su cariño y apoyo.

A mis amigos y familia pilar fundamental al inicio de mi formación.

A mis tutores, Dr. Gonzalo Rodríguez y Dra. Patricia Palma, por su guía, tiempo dedicado y conocimientos brindados.

Al equipo del laboratorio de microbiología e inmunología oral de la facultad de Odontología de la Universidad de Chile, por su buena disposición.

A la Universidad de Chile, a todos los funcionarios y docentes que logré conocer, gracias por formarme como profesional y como persona.

**ii. INDICE**

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	11
2.1. Caries dental .....	11
2.2. Probióticos .....	13
2.3. Modelos de caries .....	17
2.4. Planteamiento del problema .....	19
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	20
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	20
<b>5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	20
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
6.1. Diseño experimental.....	21
6.2. Determinación del tamaño muestral.....	22
6.3. Obtención de las muestras.....	22
6.4. Corte y montaje de bloques de esmalte en armazón metálico.....	22
6.5. Estudios de viabilidad y co-cultivo.....	25
6.6. Obtención y filtrado de saliva.....	26
6.7. Formación de biopelícula de <i>S. mutans</i> .....	28
6.8. Formación de lesión de caries <i>in vitro</i> .....	29
6.9. Control de pureza de pocillos.....	31
6.10. Evaluación de pH.....	31
6.11. Recolección y almacenamiento de muestras.....	32
6.12. Evaluación de la microdureza superficial de Vickers.....	32
6.13. Análisis estadístico.....	34

	6
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
7.1. Controles internos.....	34
7.1.1 Estudios de viabilidad y co-cultivo.....	34
7.1.2 Control de pureza de pocillos.....	36
7.2. Evaluación de pH.....	37
7.3. Determinación de la microdureza.....	37
7.4. Comparación de la microdureza.....	38
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	<b>40</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>44</b>
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>45</b>
<b>11. ANEXOS</b> .....	<b>58</b>

### iii. RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** La enfermedad de caries se define como una enfermedad crónica, no transmisible y mediada por bacterias que provoca la destrucción de los tejidos duros del diente. Es la más prevalente dentro de las afecciones orales por un gran margen de diferencia. Dentro de la amplia gama de opciones para el manejo de esta enfermedad, ha surgido la modificación de la microbiota a través del uso de probióticos. Entre los probióticos estudiados en salud oral, los *Lactobacillus spp* han sido los que cuentan con un mayor número de investigaciones, destacando en el control biológico de caries. Se trata con este trabajo proponer probióticos disponibles en el mercado, que puedan ayudar en el manejo de la enfermedad de caries.

**OBJETIVOS:** Establecer diferencias en la microdureza superficial entre bloques de esmalte humano en un modelo *in vitro* de caries con y sin la aplicación de probióticos comerciales.

**MATERIALES Y MÉTODOS:** Se simuló en un modelo *in vitro* un ambiente cariogénico utilizando la formación de una biopelícula acidogénica de *S. mutans* en caldo *BHI*, sobre bloques de esmalte humano de 3mm x 3mm x 3mm, unidos a un armazón metálico. Se contó con 3 grupos controles; un control negativo (sin exposición a sacarosa), un control positivo (con exposición a sacarosa), un control probiótico (con exposición a sacarosa y al probiótico *L. rhamnosus*) y 2 grupos con exposición a sacarosa y probióticos comerciales (*L. reuteri* y una mezcla entre *P. pentosaceus* con *B. longum*). Estos bloques fueron expuestos durante 5 días, 4 veces al día a sacarosa, simulando los momentos de “festín y hambruna”, y 1 vez al día a los probióticos previamente mencionados. Al finalizar el experimento, las muestras fueron despegadas de su armazón y se evaluó en cada una la microdureza superficial, realizando medidas en 3 puntos diferentes de su superficie del esmalte. Se obtuvo un promedio por muestra y por grupo.

**RESULTADOS:** En el estudio realizado se observó el efecto tópico de los probióticos *L. reuteri* y de la mezcla entre *P. pentosaceus* con *B. longum* sobre el esmalte dental. Las muestras expuestas a sacarosa/probióticos, presentan microdureza similares entre sí. Si bien, se observó que los grupos probióticos

tienden a evidenciar un promedio mayor en comparación con el control positivo, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa. Los resultados sugieren una disminución de la actividad acidogénica de *S.mutans*.

CONCLUSIONES: Los probióticos comerciales de las cepas *L. reuteri* y una mezcla entre *P. pentosaceus* con *B. longum* poseen el potencial de disminuir la desmineralización en un modelo *in vitro* de caries mediado por bacterias, sin embargo, no se observó diferencia estadísticamente significativa en los resultados.

## 1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de caries se define actualmente como una enfermedad crónica, no transmisible, modulada por factores biológicos, conductuales, psicosociales, ambientales, en donde el consumo frecuente de carbohidratos fermentables provoca un cambio ecológico en la biopelícula dental que lleva a una disbiosis y un consecuente incremento en la producción de ácidos orgánicos. (Vita, M. y cols. 2020). La OMS estima que cerca del 50% de la población mundial padece alguna enfermedad oral, siendo la enfermedad de caries tanto en dientes deciduos como permanentes la enfermedad oral más prevalente (Jain, N. y cols. 2023).

Según estudios nacionales disponibles, a los 2 años de edad la prevalencia de caries es de un 17,5%, de 49,6% a los 4 años y de 70,4% a los 6 años. La prevalencia de caries a los 12 años es de 62,5%, esta cifra va aumentando con la edad hasta llegar a un 99,4% en adultos entre 67 a 74 años (Ministerio de Salud, 2021).

Si bien la enfermedad de caries no es un peligro para la vida, puede significar una gran incomodidad y un gran impacto en el estado anímico de las personas que lo padecen, además de un significativo impacto monetario al tratar la enfermedad (Chen y Wang 2010). Aún más relevante, en personas con lesiones de caries no tratadas se puede observar una deficiencia masticatoria, originando una alteración en la nutrición y alimentación, llegando en casos más extremos a una dificultad en el habla (Duarte, I. 2015).

La caries dental es definida hoy en día como una enfermedad crónica no transmisible (ECNT). Estas enfermedades son aquellas que no pueden ser adquiridas mediante contagio de una persona a otra, en este tipo de enfermedades los comportamientos personales y elecciones de vida juegan un rol fundamental (Manderson y Jewett, 2023). La enfermedad de caries comparte los mismos factores biológicos y no biológicos que otras ECNT; edad, genética, estilo de vida, dieta, situación socioeconómica, entre otras (Twetman, S. y cols, 2018). También poseen las mismas características que otras ECNT; son enfermedades de larga duración y lenta progresión, fuerte asociación con factores de riesgo modificables y un impacto desproporcionadamente mayor en población más

vulnerable (Giacaman y cols, 2022). La prevención de la enfermedad de caries puede ayudar a la prevención de las ECNT.

Recientemente, ha habido un cambio en el paradigma de cómo se ven y estudian las enfermedades orales en general y específicamente la caries dental. Este cambio, es lo que ha llevado a buscar otras estrategias para abordar su tratamiento, entre las cuales, actualmente se estudian los probióticos.

Los probióticos son definidos por la Organización Mundial de la Salud como cualquier microorganismo vivo que cuando es administrado en cantidades adecuadas, otorga efectos beneficiosos al hospedero (OMS 2006). Los probióticos se han usado en áreas como la ganadería, la agricultura y hasta la medicina. En el área médica se han utilizado en diferentes campos como la gastroenterología, inmunología, oncología, entre otros (Foligné, B. 2012; Joseph, B. y cols. 2013; Lefevre, M. y cols. 2015 Zaura, E., y Twetman, S. 2019; Golchin, A. 2023).

Desde el punto de vista de la salud oral los probióticos han sido estudiados con respuestas positivas para el tratamiento de enfermedades orales (Näse, L. y cols. 2001; Ahola, A. y cols. 2002; Juneja, A. y Kakade, A. 2012; Campus, G. y cols. 2014; Nishihara, T. y cols 2014; Alou, M. y cols. 2015; Ratna, S. y cols. 2020). Se ha demostrado que cepas de bacteria *Limosilactobacillus reuteri* (*L. reuteri*) son capaces de interferir en la formación *in vitro* de la biopelícula de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) (Söderling, E. y cols. 2010) y que el uso de *Pediococcus pentosaceus* (*P. pentosaceus*) y *Bifidobacterium longum* (*B. longum*), podrían tener un efecto terapéutico para el manejo de la enfermedad de caries dental (Astó, E. y cols. 2021; Chen, K. y cols. 2021).

El objetivo de este estudio es observar el efecto de los probióticos *L. reuteri* y de la mezcla de *P. pentosaceus* y *B. longum* sobre la desmineralización del esmalte dental con el fin de encontrar otra alternativa para el manejo de la enfermedad de caries dental.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Caries dental

El ser humano ha co-evolucionado con los microorganismos que colonizan sus superficies a lo largo del tiempo, en una simbiosis que se ha caracterizado por una integración funcional y una adaptación mutua, constituyendo un super organismo único denominado holobionte (Killian, M. y cols. 2016). Se ha estimado que poseemos una relación de células eucarionte/procarionte de 1:10, es decir que por cada célula humana podemos encontrar 10 células bacterianas (Luckey, T. 1972). En estudios más recientes esa cifra se ha modificado, se propone la presencia de 1,3 bacterias por cada célula humana (Sender y cols. 2016). Este conjunto de microorganismos que reside tanto dentro como sobre el cuerpo humano, que se organizan en comunidades funcionales y estructuradas y que se adhieren a las superficies, recibe el nombre de microbiota y cumple diversas funciones en el cuerpo, desde una barrera protectora para microorganismos exógenos, hasta productores de vitaminas y energía, incluso como regulador del sistema cardíaco (Chow y cols. 2010; Relman 2012). El ecosistema oral es un sistema biológico altamente complejo, diverso y dinámico que se puede ver influenciado por múltiples factores como la temperatura, disponibilidad de nutrientes, pH, uso de antimicrobianos, estilos de vida y otros, que le pueden ocasionar perturbaciones transitorias o permanentes (Kilian y cols, 2016). Cuando la perturbación es sostenida en el tiempo, se rompe el fino equilibrio entre la microbiota oral y el hospedero humano lo que trae como consecuencia que el equilibrio del holobionte transite desde un estado de salud hacia un estado de enfermedad, de naturaleza disbiótica (Marsh, P. 2018). Como ejemplo de disbiosis locales se describen las otitis, algunas enfermedades de la piel y patologías genitourinarias (Brubaker y cols, 2017). La disbiosis se refiere a un desequilibrio o alteración en la composición y función de la microbiota, que son los microorganismos que habitan en un entorno particular, como el intestino o la piel (Litvak y Bäumlér, 2019). En la cavidad oral enfermedades gingivoperiodontales y enfermedad de caries responden también a esta clasificación (Simon-Soro, A. y Mira, A. 2015).

La boca, está colonizada por una microbiota que posee gran variedad de microorganismos, como levaduras, virus, micoplasmas, protozoos y en mayor

cantidad bacterias. Esta microbiota es característica y distinta de la microbiota en sectores más vecinos como la piel o el tracto digestivo (Devine, D. y cols., 2015). Estos microorganismos quedan encerrados dentro de una matriz extracelular autoproducida, que se adhieren a superficies bióticas o abióticas, esta compleja matriz con variedad de microorganismos es conocida como biopelícula (Chacko y Dhaded, 2021). En la boca la biopelícula se puede encontrar en la mucosa oral y en la superficie de los dientes. La biopelícula dental es natural y tiene un efecto positivo importante en el mantenimiento de la salud bucal, y muchas de las bacterias residentes aportan importantes beneficios. Existe una compleja red de interdependencias entre los miembros de la biopelícula, que contribuyen a mantener la estabilidad de la comunidad y la resistencia al cambio (Marsh, P. 2018).

Por su parte, la saliva cumple un papel fundamental en el mantenimiento de la microbiota oral beneficiosa para el hospedero. Tiene una serie de funciones que incluyen; actuar como tampón para mantener un pH favorable para el adecuado crecimiento y metabolismo de la microbiota oral, eliminar sustratos, eliminar productos de fermentación, eliminar bacterias ligeramente adheridas, entregar componentes de las defensas innatas y adaptativas del hospedero, y proporcionar sustratos que apoyan el crecimiento de microorganismos orales beneficiosos (Marsh, P. y cols. 2016).

Los dientes están compuestos naturalmente por esmalte, dentina y cemento. Cada uno posee cantidades distintas de tejido inorgánico de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) principalmente. El esmalte posee un contenido mineral de un 90% aproximadamente, la dentina de un 70% y el cemento de un 45%. Este tejido inorgánico se mantiene constantemente en un proceso dinámico de desmineralización y remineralización, manteniendo un equilibrio entre ambos procesos (Abou Neel, E. y cols. 2016). La enfermedad de caries se define actualmente como una enfermedad crónica no transmisible, modulada por factores biológicos, conductuales, psicosociales y ambientales, en la que el consumo frecuente de carbohidratos fermentables provoca un cambio ecológico en la biopelícula dental que lleva a una disbiosis y un consecuente incremento en la producción de ácidos orgánicos. Esto provoca que el equilibrio tienda a la

desmineralización, lo que produce en consecuencia una pérdida de minerales en los tejidos duros del diente, pudiendo resultar en una lesión de caries (Vita, M. y cols. 2020).

Al ser la enfermedad de caries un proceso continuo entre los fenómenos de remineralización y desmineralización de los tejidos duros del diente, se consensuó que es más preciso hablar de manejo, cuidado o control de caries más que de prevención de la enfermedad (Vita, M. y cols. 2020). En etapas iniciales, las lesiones de caries de esmalte presentan desmineralización que puede estar en cualquier sitio a lo largo de su superficie, siendo unos sitios más propensos que otros. Esta situación si no llegase a ser revertida puede resultar en fallo mecánico y en una posterior cavitación, lo que conlleva en muchas oportunidades a un ciclo vicioso de restauración (Pitts, 2004). Por otra parte, los enfoques preventivos y terapéuticos para el manejo de la caries dental han cambiado significativamente durante los últimos años, principalmente debido al aumento sostenido en la investigación, generando así, mayor evidencia para la toma de decisiones clínicas, con diferentes propuestas de tratamiento que varían según la severidad de la enfermedad y si la lesión de caries está o no cavitada. En el tratamiento existen variadas alternativas para el manejo de la enfermedad como; la reducción en la frecuencia del consumo de azúcares, la aplicación de barniz fluorado (22600 ppm F<sup>-</sup>), la eliminación de las lesiones de caries con su posterior restauración directa o indirecta (Muñoz-Sandoval, C. y cols. 2022). Complementariamente a estas posibilidades ha surgido la opción del manejo de la enfermedad de caries mediante la modificación de la microbiota a través del uso de probióticos.

## 2.2. Probióticos

La primera vez que se usó la palabra probiótico fue por el microbiólogo ucraniano Iliá Méchnikov en 1907, quien atribuía la longevidad de los campesinos balcánicos al consumo de lácteos fermentados. La palabra deriva de la conjugación de dos palabras en latín *Pro* “a favor de” y *Bioto* “Vida” (Metchnikoff, E. 1907). Más tarde en 1965 Lilly y Stilwell, usarían esta palabra para nombrar a toda sustancia secretada por microorganismos que estimulan el crecimiento de otro

microorganismo (Lilly y Stillwell, 1965). Años más adelante, Fuller redefinió la palabra como un complemento alimenticio microbiano vivo que afecta beneficiosamente al animal hospedero mejorando su equilibrio intestinal (Fuller, 1989). Hoy en día la OMS define probiótico como cualquier microorganismo vivo, generalmente bacterias, que a la ingesta en una cantidad adecuada otorga beneficios saludables al hospedero, distintos a los efectos nutricionales que podría aportar (OMS 2006).

El uso de los probióticos abarca industrias como la ganadería y agricultura hasta la medicina en distintas áreas como la gastroenterología y la inmunología (Zaura, E. y Twetman, S. 2019). En el área odontológica, existe evidencia sobre el uso de probióticos como medida de prevención de enfermedades orales.

En general *Lactobacillus spp*, son los probióticos bacterianos que tienen mayor uso en salud oral, destacando en control biológico de caries a *Lactocaseibacillus rhamnosus*, *Limosilactobacillus reuteri* (*L. reuteri*) y *Lactobacillus paracasei*, entre otros (Hoffman, A., y Daniels R. 2017).

El primer estudio que evaluó el uso de probióticos para el manejo de la enfermedad de caries dental se remonta al año 2001, donde se observó una menor incidencia de caries después del consumo de leche que contenía *Lactocaseibacillus rhamnosus GG (LGG)*, en comparación con el consumo de leche sin probióticos, en una población infantil (Näse, L. y cols. 2001). Este grupo de investigación también evaluó el efecto de los probióticos en la prevención de caries durante 3 semanas. Se observó que el consumo de queso suplementado con los probióticos *LGG* y *Lactocaseibacillus rhamnosus LC* por adultos jóvenes redujo en 20% y 27% la concentración oral de *S. mutans* y levaduras, respectivamente (Ahola, A. y cols. 2002). Por otra parte, Juneja y Kakade aportaron con su trabajo en el cual se administró leche suplementada con *Lactocaseibacillus rhamnosus hct 70* durante 3 semanas a niños con actividad de caries media y alta. Se recolectaron muestras de saliva en tres ocasiones: en el período inicial, inmediatamente después de la intervención y 3 semanas después de la intervención. La suplementación con probióticos redujo el recuento de *S. mutans* inmediatamente después de la intervención y también después de 3

semanas, donde el efecto fue significativamente más pronunciado en comparación con el valor inicial y el placebo. Teniendo en cuenta que los niños utilizaron pasta dental no fluorada y no recibieron aplicaciones de flúor ni otros tratamientos dentales durante el período experimental, los autores sugieren que con estos resultados el efecto terapéutico observado se atribuyó a la suplementación con probióticos (Juneja, A. y Kakade, A. 2012). Nishihara y colaboradores por su parte, observaron que la suplementación con cepas aisladas de *Ligilactobacillus salivarius* WB21 y TI 2711 durante 2 semanas, disminuyó el recuento de *S. mutans* y aumentó el recuento de *Lactobacillus spp.* en la saliva de adultos, mejorando la salud bucal y reduciendo el riesgo de caries (Nishihara, T. y cols 2014). *Levilactobacillus brevis* CD2 también redujo el recuento de *S. mutans* y la acidogenicidad de la placa cuando se administró a niños con alto riesgo de caries durante 6 semanas. A los niños se les indicó que no usaran productos que contuviesen flúor en su formulación, por lo tanto, al igual que en el estudio anterior estos autores determinaron que el efecto anticariogénico se asoció a la suplementación con probióticos (Campus, G. y cols. 2014). Así mismo, se evidenció en un estudio clínico aleatorizado realizado en una población infantil con índice “ceo-d” (diente primario cariado, extraído, u obturado) igual a 0, donde se administró durante 7 días helado suplementado con los probióticos *Bifidobacterium lactis* Bb-12 y *Lactobacillus acidophilus* La-5, luego de los 7 días de ingesta de helado, se observó una disminución en el recuento de *S. mutans* (Ashwin, D. y cols. 2015). Jindal y colaboradores realizaron un estudio clínico aleatorizado con polvos liofilizados de *Bacillus coagulans* y una mezcla de *Lacticaseibacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium spp.* En este estudio se le indicó ingerir estos polvos durante 14 días a una población infantil, para luego realizar un recuento de *S. mutans* antes de iniciar el experimento y pasado los 14 días. Los autores reportan una reducción en el recuento de *S. mutans* en saliva en relación al recuento inicial (Jindal, G. y cols. 2011).

En el estudio realizado por Sandoval y colaboradores en el año 2021, se observó una disminución en la aparición de lesiones de caries en una población infantil durante 10 meses, en el grupo al que se le administró leche suplementada con *Lacticaseibacillus rhamnosus* SP1, en comparación al grupo control al que no se

le administró probiótico alguno (Sandoval, F. y cols. 2021). También en un estudio en el que se administró tabletas masticables que contenían el probiótico *Ligilactobacillus salivarius* a una población infantil durante 2 semanas, se observó una disminución en la aparición de lesiones de caries tras un seguimiento de 12 meses posteriores a la intervención (Staszczyk, M. y cols. 2022). Sumado a los estudios ya mencionados, se ha investigado de manera preliminar la ingesta de probióticos a corto y largo plazo en la población infantil chilena, evidenciando una reducción en la incidencia de caries entre los niños preescolares (Rodríguez G. y cols. 2016).

Por su parte, el probiótico *Pediococcus pentosaceus* (*P. pentosaceus*), ha evidenciado efectos antimicrobianos sobre especies patógenas como *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Lele, V. y cols. 2019; Nanasombat, S. y cols. 2017) También, se ha observado que posee un potencial inhibitorio de la formación de biopelícula para *Streptococcus salivarius* (Ben. F. y cols. 2016). Aún más, Chang y colaboradores concluyeron en su trabajo de investigación que la cepa de *Pediococcus pentosaceus* AC1-2 es capaz de inhibir el crecimiento y la formación de biopelícula de *S. mutans* (Chang, L. y cols. 2022).

A su vez, el uso en conjunto de la cepa *Bifidobacterium longum* (*B. longum*), junto con *Lactobacillus spp.* como enjuague bucal, evidenció una disminución en el recuento de *Porphyromonas gingivalis* en una población sometida a tratamiento de ortodoncia (Goyal, N. y cols. 2019). Así mismo, se ha investigado el efecto en conjunto de fórmulas probióticas comerciales que poseen cepas *B. longum* y *Lactobacillus spp.* sobre el recuento de *S. mutans*, en donde se observó una disminución estadísticamente significativa en comparación con el recuento inicial (Jindal, G. y cols. 2011; Yousuf, A. y cols. 2015).

También, cabe destacar el probiótico *L. reuteri*, que se caracteriza por poseer efectos inhibitorios sobre el crecimiento y formación de biopelícula de *S. mutans*, así también, sobre la disminución en el recuento en saliva de *S. mutans* (Nikawa, H. y cols. 2004; Caglar, E. y cols. 2006; Kang, M. y cols. 2011). Por su parte, Stensson y colaboradores evaluaron en una población infantil de 9 años de edad

quienes ingirieron el probiótico *L. reuteri* durante el primer año de vida, como también sus madres en el último mes de gestación. Los resultados reportaron una disminución en la prevalencia de caries al compararlo con el grupo placebo (Stensson, M. y cols. 2014).

Existe una variada oferta en el mercado farmacéutico de probióticos. Estos probióticos, son utilizados generalmente para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. Sin embargo, también han sido aplicados para el tratamiento de otro tipo de enfermedades como las infecciones genitourinarias e incluso benefician la reducción del colesterol en sangre. Actualmente los probióticos han sido estudiados para el manejo de varias enfermedades orales y se ha demostrado que mejoran los parámetros clínicos periodontales como la profundidad y sangrado al sondaje, y reduce el índice gingival y de placa (Rao, Y. y cols. 2012; Flichy-Fernández, A. y cols. 2010; Stamatova, I. y Meurman, J. 2009). Dentro de los probióticos de uso comercial, las principales cepas que se encuentran disponibles en el mercado son *Lactobacillus spp* y *Bifidobacterium spp*. tanto en alimentos, en su mayoría productos lácteos o fermentados, como en suplementos mono o multicepas, en forma de cápsulas, pastillas, gotas o sobres liofilizados (Mishra, S. y cols. 2020).

### 2.3. Modelos de caries

El método científico se basa en la observación de un fenómeno natural, la formulación de una hipótesis y la verificación de esta a través de experimentación. Intentando el mayor acercamiento posible a la situación real en la que fue observado dicho fenómeno (Fina B. 2013). Las ciencias biomédicas se basan en diferentes modelos para poner a prueba las hipótesis, *in vitro*, *in situ* e *in vivo*.

Los ensayos basados en un modelo *in vivo* son aquellos en los cuales hacemos el estudio en las condiciones más próximas al fenómeno observado, por ejemplo, un ensayo clínico. El trabajo en este tipo de modelos es mayor, por la gran cantidad de variables (Fina B. 2013). El modelo *in situ* es un protocolo intermedio entre *in vivo* e *in vitro*, que permite evaluar el efecto de un agente sobre muestras que pueden ser retiradas y analizadas en laboratorio (Acuña, S. y cols. 2021). Los

estudios *in vitro* intentan simular las condiciones naturales en que se realizó la observación o al menos aproximarse a las condiciones aplicadas en los experimentos *in vivo*. Estos modelos son herramientas adecuadas para el estudio de mecanismos involucrados en los fenómenos observados y entregan conocimiento que permite entender el funcionamiento de ciertos procesos, pero no aseguran que lo que ocurra *in vivo* sea lo mismo observado en el modelo *in vitro*, o que sea lo único que ocurra (Lorian, V. 1988). Algunos expertos proponen que los estudios *in vitro* podrían ser mejores que los *in vivo*; se argumenta un mejor control y condiciones éticas, así como, una reducción de errores estadísticos y menor costo (Polli, JE. 2008).

En la mayoría de los modelos de biopelícula de *S. mutans*, ésta se cultiva bajo exposición constante a carbohidratos, manteniéndola bajo estrés ácido sostenido, puesto que no simula los episodios de "festín y hambruna" de exposición a azúcares y ciclos del pH que ocurren en la cavidad oral. (Koo, H. y cols. 2003; Coenye, T. y cols 2007). Uno de los modelos *in vitro* de biopelícula modulado por *S. mutans* más replicados para el estudio de los efectos de agentes antimicrobianos en la desmineralización de esmalte, es el realizado por Ccahuana-Vásquez y Cury en el 2010. Este modelo se caracteriza principalmente por; utilizar un sustrato dental, simular los episodios de "festín y hambruna" y determinar la acidogenicidad de la biopelícula.

La evaluación del sustrato dental sometido al modelo de caries se puede realizar con diferentes metodologías. Entre los diferentes métodos existentes que permiten estudiar el estado mineral del esmalte, se destaca la micro radiografía transversa. Esta técnica se considera el *gold standard* para cuantificar cambios en la cantidad y distribución mineral (Ten y Angmar 1991). Otra metodología es la evaluación de microdureza superficial, se caracteriza por ser altamente sensible y reproducible para estudiar etapas muy tempranas de desmineralización y remineralización del esmalte (Zero y cols, 1992). Además, la microscopía electrónica de barrido resulta idónea para estudios de alta resolución de la estructura del esmalte dental, permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado (Risnes, S y Li, C. 2018). Finalmente, la microtomografía computarizada (*micro CT* por sus

siglas en inglés) es una técnica efectiva y no destructiva para la medición del espesor del esmalte, permite generar cortes continuos del tejido para evaluar el espesor y el área del esmalte, con precisión y fiabilidad. Además, a través de un *software* se pueden realizar reconstrucciones 3D. (Swain V. 2009).

#### 2.4. Planteamiento del problema

La caries dental se define como una enfermedad crónica, no transmisible y mediada por bacterias. Para la cual, se requiere seguir investigando y proponiendo nuevas estrategias para abordarla. Esto, en consecuencia, de que aún existen preocupantes cifras de prevalencia en la población nacional. El Ministerio de salud ha diseñado el “Plan Nacional de Salud Bucal 2021- 2030”, con el cual se espera contribuir a mejorar el estado de salud bucal de la población, y su principal enfoque recae en la promoción y prevención de la salud oral (Ministerio de Salud, 2021).

En este contexto, la enfermedad de caries oral continúa siendo un problema de salud pública, las investigaciones apuntan a métodos alternativos para su manejo. Una de estas alternativas son los productos que utilizan probióticos, debido a que, poseen un gran potencial por su capacidad de controlar la formación de placa y prevenir la ruptura de la homeostasis microbiana.

Si bien la mayoría de los probióticos utilizados en las investigaciones mencionadas han evidenciado una respuesta positiva en el control de la enfermedad de caries, aún existe una variada gama de opciones y presentaciones disponibles en el mercado que podrían ser potencialmente beneficiosas para el manejo de esta enfermedad. Por lo tanto, en este trabajo se propone el uso de probióticos comerciales, como alternativas para el manejo de la enfermedad de caries dental.

La pregunta de investigación que se plantea es: ¿Existen diferencias en la microdureza superficial en bloques de esmalte sometidos a un modelo de caries *in vitro* tratados con probióticos *Limosilactobacillus reuteri* y la mezcla de *Pediococcus pentosaceus/Bifidobacterium longum*, y bloques de esmalte no sometidos a este tratamiento?

El propósito de este estudio es obtener evidencia del efecto que poseen los probióticos *Limosilactobacillus reuteri* y la mezcla de *Pediococcus pentosaceus* con *Bifidobacterium longum* sobre la superficie del esmalte dental en un modelo *in vitro* de caries mediado por bacterias.

### **3. HIPÓTESIS**

Bloques de esmalte humano expuestos a sacarosa y probióticos *Limosilactobacillus reuteri* y la mezcla de *Pediococcus pentosaceus* con *Bifidobacterium longum* presentarían mayores valores de microdureza superficial cuando se comparan con bloques de esmalte expuestos únicamente a sacarosa y valores similares con bloques de esmalte expuestos a sacarosa/*Lactocaseibacillus rhamnosus GG* en un modelo de caries *in vitro* mediado por bacterias.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Establecer diferencias en la microdureza superficial de bloques de esmalte humano en un modelo *in vitro* de caries donde se administran probióticos *Limosilactobacillus reuteri* y la mezcla de *Pediococcus pentosaceus* con *Bifidobacterium longum* y los grupos controles.

### **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar la microdureza superficial de bloques de esmalte humano que se les administran probióticos *Limosilactobacillus reuteri* y la mezcla de *Pediococcus pentosaceus* con *Bifidobacterium longum* en un modelo *in vitro* de caries.

Determinar la microdureza superficial de bloques de esmalte humano de los grupos controles en un modelo *in vitro* de caries.

Comparar la microdureza superficial de los bloques de esmalte humano de los grupos experimentales con los grupos controles.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Diseño experimental

La presente investigación fue realizada basada en el modelo experimental de caries descrito por Ccahuana-Vásquez y Cury (2010). Se llevó a cabo la simulación de un ambiente cariogénico mediado por una biopelícula monoespecie formada por *S. mutans*, en donde se utilizó como muestra bloques de esmalte humano. Las muestras fueron expuestas a sacarosa al 10% 4 veces al día en placas de poliestireno estériles de 12 pocillos. En este ambiente cariogénico se administró una vez al día a 10 bloques de esmalte el probiótico *L. reuteri*, a 10 bloques de esmalte la mezcla de *P. pentosaceus* con *B. longum* y a 10 bloques de esmalte el probiótico LGG, este último fue administrado como control probiótico. También, se seleccionaron como control positivo 10 bloques de esmalte que fueron expuestos solo a sacarosa al 10% y como control negativo 10 bloques de esmalte que no fueron expuestos ni a sacarosa ni a probióticos (Tabla 1). Los bloques de esmalte fueron evaluados por microdureza de Vickers una vez acabada la exposición.

<b>Grupo 1 control negativo (C-)</b>	Sin sacarosa	Sin probiótico
<b>Grupo 2 control positivo (C+)</b>	Sacarosa	Sin probiótico
<b>Grupo 3 control probiótico (CP)</b>	Sacarosa	<i>Lacticasseibacillus rhamnosus GG</i>
<b>Grupo 4 (P+B)</b>	Sacarosa	<i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Bifidobacterium longum</i>
<b>Grupo 5 (L)</b>	Sacarosa	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>

**Tabla 1. Descripción de los grupos utilizados en el modelo experimental.**

### 6.2. **Determinación del tamaño muestral**

La unidad de observación de este estudio está definida por los bloques de esmalte. Por lo cual, para el cálculo de tamaño muestral se tomó en consideración la variable primaria de estudio (microdureza) con los siguientes aspectos: desviación estándar  $\pm 18,9$ , riesgo alfa de 0,05 y un riesgo beta de 0,2 en un contraste unilateral, estimando una tasa de pérdidas de seguimiento del 5% y en el cual se precisan 10 para cada grupo, siendo un total de 50 muestras.

### 6.3. **Obtención de las muestras**

Las muestras utilizadas fueron obtenidas de terceros molares incluidos proporcionados voluntariamente por pacientes que fueron sometidos a exodoncias por indicación de ortodoncia en el “Instituto Nacional de Ortodoncia”. Los pacientes donantes firmaron un consentimiento informado aprobado por el comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo 1), donando el material biológico para uso exclusivo de este estudio. Los dientes fueron inspeccionados, excluyendo aquellos que presentaran defectos en el esmalte o fracturas. Los molares seleccionados fueron almacenados en timol al 2% y refrigerados a 4°C para su conservación hasta el momento de su uso.

### 6.4. **Corte y montaje de bloques de esmalte en armazón metálico**

Los molares seleccionados, fueron luego cortados mediante instrumental rotatorio de alta velocidad y piedras diamantadas (ISO 806.314.213.524.012) y rectificadas con discos de carburo de silicio (Figura 1), para así obtener bloques de esmalte en medidas aproximadas de 3mm x 3 mm x 3mm. La preparación de las muestras se realizó con medidas de refrigeración (uso de agua y desgaste intermitente), para evitar el sobrecalentamiento y posible daño irreversible de las muestras, así mismo, las superficies de esmalte no fueron intervenidas. Una vez finalizados los cortes, se almacenaron los bloques de esmalte en tubos de microcentrífuga (Eppendorf®) con timol al 2% a 4°C.



**Figura 1. Rectificación de los cortes de bloques de esmalte.** Bloque de esmalte sujeto con portaagujas sometido a desgaste con disco de carburo de silicio (carborundum).

Luego de preparar los bloques de esmalte, se confeccionó un armazón metálico con alambre de ortodoncia de 0,8mm de diámetro para cada uno de los bloques. Las muestras fueron fijadas a los alambres con adhesivo universal y resina Flow (Filtek™ Supreme Flowable, 3M), en el lado opuesto a la superficie de esmalte, con la finalidad de que cada bloque pudiese permanecer en suspensión al interior de los pocillos de las placas de cultivo. No se realizó grabado ácido sobre ninguna de las superficies del bloque.



**Figura 2. Ensamblaje de armazones usados en el modelo.** Resina compuesta fluida (Filtek™ Supreme Flowable, 3M), adhesivo universal (One Coat Bond SL, Coltene), Lámpara de fotocurado, bloque de esmalte y alambre 0,8mm.

Posteriormente, los bloques de esmalte montados en su correspondiente armazón metálico fueron colocados en tubos centrífuga de 50mL (Falcon®) con agua destilada, para luego, ser esterilizados en autoclave a 121°C por 20 minutos. Las muestras permanecieron a 4° C en los tubos con agua destilada hasta el momento de su uso.

### 6.5. Estudios de viabilidad y co-cultivo

Previo al inicio del modelo experimental, se realizó un ensayo de viabilidad para las cepas probióticas *L. reuteri*, la mezcla de *P. pentosaceus* con *B. longum* y LGG, junto a un ensayo de co-cultivo de las cepas mencionadas con *S. mutans*. El objetivo de estos ensayos es determinar la capacidad de sobrevivencia y coexistencia de estas especies en el modelo de estudio planteado.

Todos los estudios de viabilidad fueron realizados sembrando un inóculo predeterminado de la suspensión de probiótico indicado por el fabricante en placas de agar estériles, con su respectivo medio de cultivo, descrito en la tabla 2. La siembra en agar se realizó, utilizando un asa de Drigalski o un asa de platino (en el caso de Vivera®), para su posterior incubación en condiciones de microaerofilia a 37° C durante 48 horas.

<b>Nombre comercial</b>	<b>Cepa bacteriana</b>	<b>Medio de cultivo</b>
Vivera®	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus GG</i>	Agar MRS
Biogaia®	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	Agar MRS
Multiflora®	<i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Bifidobacterium longum</i>	Agar MRS Agar Triptona – Soya

**Tabla 2. Descripción de los medios de cultivo utilizados para los estudios de viabilidad y co-cultivo.**

Se realizó en paralelo, la siembra de la cepa de colección de *S. mutans* ATCC 25175 perteneciente al cepario de la Dra. Patricia Palma del laboratorio de microbiología e inmunología oral de la facultad de Odontología de la Universidad de Chile. La bacteria se inoculó en agar triptona extracto de levadura cisteína

(*TYCS* por sus siglas en inglés), selectivo para *S. mutans* y la incubación se llevó a cabo en condiciones de microaerofilia a 37°C durante 48 horas.

Finalizado el tiempo de incubación y evidenciado la presencia de crecimiento en las placas, se continuó con los ensayos de co-cultivo. Con este fin, 5 colonias obtenidas de las placas de agar de cada probiótico y de agar *TYCS*, se inocularon en tubos de ensayo estériles, que contenían cada uno 5ml de caldo Infusión Cerebro Corazón (*BHI* por sus siglas en inglés), para su posterior incubación en condiciones de microaerofilia a 37°C durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo y habiendo evidenciado crecimiento en los tubos, el caldo bacteriano se ajustó a la turbidez de 0,5 McFarland, utilizando un espectrofotómetro (UV-VIS de haz dividido Halo RB-10). De los caldos ajustados, se inoculó 2ml de caldo *BHI* de cada probiótico junto con 2ml de caldo *BHI* con *S. mutans* en un tubo de ensayo estéril. Cada uno de los tubos fueron incubados nuevamente en condiciones de microaerofilia a 37° C durante 48 horas.

Finalmente, transcurrido el tiempo de incubación, se sembró 100µL del contenido de cada uno de los co-cultivos en placas con agar MRS, placas con agar triptona de soya (*TSA* por sus siglas en ingles) y placas con agar *TYCS*, se incubaron en condiciones de microaerofilia a 37°C durante 48 horas. A las colonias obtenidas se les realizó un análisis macromorfológico y micromorfológico con el fin de determinar características coloniales, tipo de pared, agrupación y morfología celular coincidentes con las cepas probióticas y con la cepa de *S. mutans* ATCC 25175 involucradas en este ensayo.

#### 6.6. Obtención y filtrado de saliva

La recolección de saliva se realizó a partir de 3 individuos voluntarios sistémicamente sanos, no fumadores, sin enfermedad de caries, ni consumo de antibióticos en los últimos 3 meses. Se les indicó no consumir alimentos ni líquidos 2 horas antes, junto con una correcta higiene oral 30 minutos previo a la recolección de saliva. Se colectó un *pool* de saliva de 65mL que fue separado en 2 tubos centrífuga (Falcon®) de 50mL, para su posterior procesamiento. El contenido de los tubos fue centrifugado a 4500 rpm x 20 min a 4°C en la centrífuga

Megafuge™ 8R (Heraeus™, Thermo Scientific, Alemania). Luego, el sobrenadante de saliva fue traspasado a jeringas de 20mL estériles conectada a un filtro marca EDLA® tipo Syringe Filter de 0,22µm, dispuesto sobre una botella de borosilicato de 200mL estéril, bajo campana de flujo laminar (Figura 3). El filtrado se llevó a cabo de manera manual aplicando una leve presión digital sobre la jeringa, obteniendo una muestra de saliva estéril por filtración. Finalizado el filtrado se sembró 100µL de saliva en dos placas de agar sangre estéril y se incubaron en condiciones de aerofilia y microaerofilia a 37°C durante 48 horas.

El filtrado de saliva fue realizado hasta que no se observó crecimiento de colonias en el agar. Una vez obtenida la saliva estéril se almacenó a 4°C hasta el momento de su utilización.



**Figura 3. Filtrado de saliva manual bajo campana de flujo laminar.**

### 6.7. Formación de biopelícula de *S. mutans*

Para la formación de la biopelícula se utilizó una suspensión de la cepa de *S. mutans* ATCC 25175 en caldo *BHI* + glucosa 0,1mM con sacarosa estéril al 10% (Figura 4).

Para la elaboración de la suspensión, se inocularon 5 colonias de *S. mutans* en un tubo de ensayo con caldo *BHI* estéril y se incubó en condiciones de microaerofilia durante 48 horas a 37°C.

La suspensión bacteriana fue preparada en una botella de borosilicato de 200mL estéril en las siguientes proporciones; 128,75mL de caldo *BHI* + glucosa 0,1mM, 14,38mL de sacarosa 10% y 6,88mL de *S. mutans* en caldo *BHI* ajustado a una turbidez de 0,5 McFarland.

Una vez preparada la suspensión se realizó la formación de película adquirida. Para esto, se depositó 3,5mL de saliva estéril en una placa de cultivo de poliestireno estéril, junto a los bloques de esmalte en su armazón metálico. Posteriormente, las placas fueron llevadas a una incubadora y fueron agitadas de manera manual cada 5 minutos durante 30 minutos a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo, bajo campana de flujo laminar, las muestras de esmalte fueron trasladadas a una nueva placa estéril.

Con las muestras en la nueva placa, se procedió a depositar en cada pocillo 3,5mL de la suspensión bacteriana. Las placas fueron luego incubadas en condiciones de microaerofilia a 37°C durante 36 horas, esto permitió la formación de biopelícula de *S. mutans* sobre las muestras de esmalte.



**Figura 4. Placa con caldo *BHI*.** Cada pocillo contiene caldo *BHI* + glucosa 0,1mM, con *S. mutans* y sacarosa estéril al 10%.

#### 6.8. Formación de lesiones de caries *in vitro*

Una vez transcurridas las 36 horas, se procedió a realizar el proceso de desmineralización basado en el protocolo de Ccahuana-Vásquez y Cury, 2010.

El primer día del protocolo, se realizó el traslado de las muestras a una placa estéril donde se dispensaron 3,5mL de caldo *BHI* + glucosa 0,1mM. Los días siguientes, antes de la primera exposición del día, se realizó el cambio del caldo *BHI* de cada una de las placas, por 3,5mL de caldo *BHI* fresco + glucosa 0.1mM para mantener las bacterias activas.

Se preparó cada día una placa de cultivo con 4mL de sacarosa 10% dispensada en sus pocillos y de la misma manera otra placa con 4mL de suero fisiológico (NaCl 0.9%). El procedimiento se realizó con insumos estériles y bajo campana de flujo laminar.

Las muestras se mantuvieron suspendidas en una solución de sacarosa estéril al 10% durante 5 minutos, eliminando los excesos de sacarosa con un enjuague de 3 inmersiones en suero fisiológico estéril (Figura 5), se realizaron 4 exposiciones al día durante 5 días con el objetivo de simular los momentos de “festín y hambruna”

a lo largo del día (Ccahuana-Vásquez, R. y Cury, J. 2010). Adicionalmente, en la primera exposición del día, los grupos probióticos fueron tratados con sus respectivas cepas mediante instilación en el caso de *LGG* e inmersión en el caso de *L. reuteri* y la mezcla de *P. pentosaceus* con *B. longum* (Figura 6).

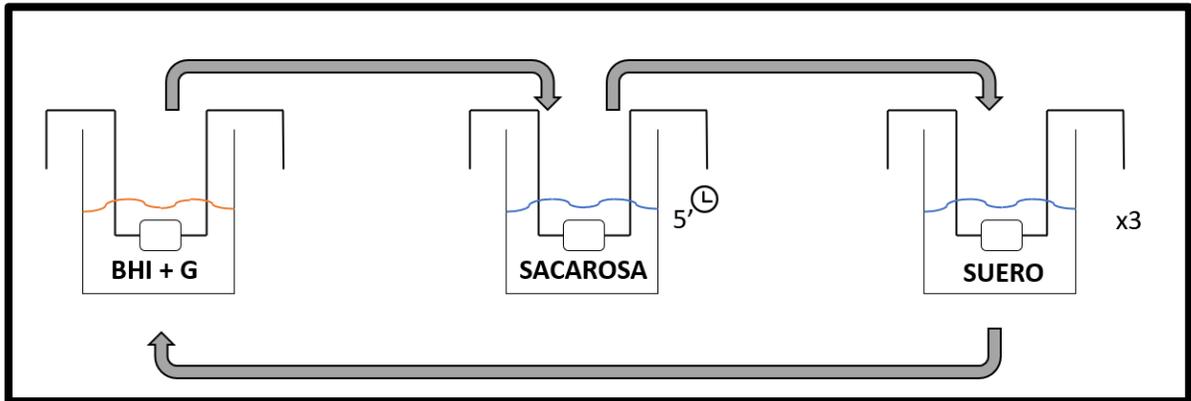


Figura 5. Esquema de exposición de las muestras del grupo control positivo.

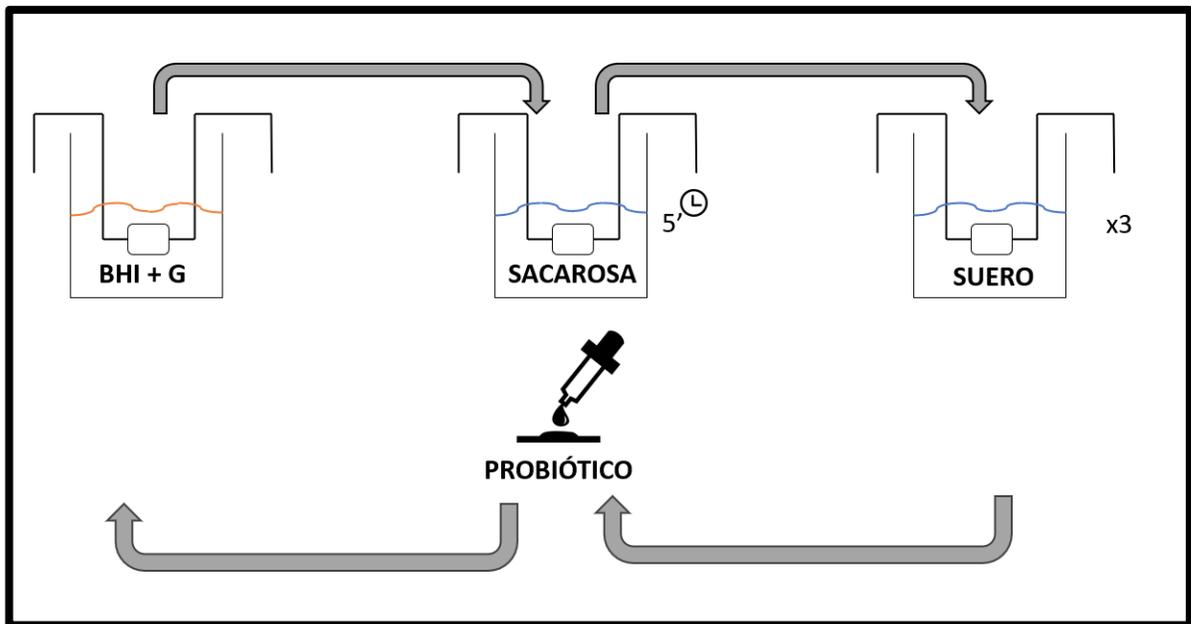


Figura 6. Esquema de exposición de las muestras de los grupos probióticos.

### 6.9. Control de pureza de cultivos

Para comprobar la pureza de las placas, se sembró una alícuota de cada pocillo en placa de agar antes de realizar el cambio de caldo *BHI*, para corroborar que las cepas utilizadas en la investigación estuvieran presentes. Cada una de estas placas fueron incubadas en condiciones de microaerofilia a 37°C durante 24 horas. También se realizó un análisis micromorfológico, tomando muestras de cada placa al azar y realizando un frotis para tinción Gram.

### 6.10. Evaluación de pH

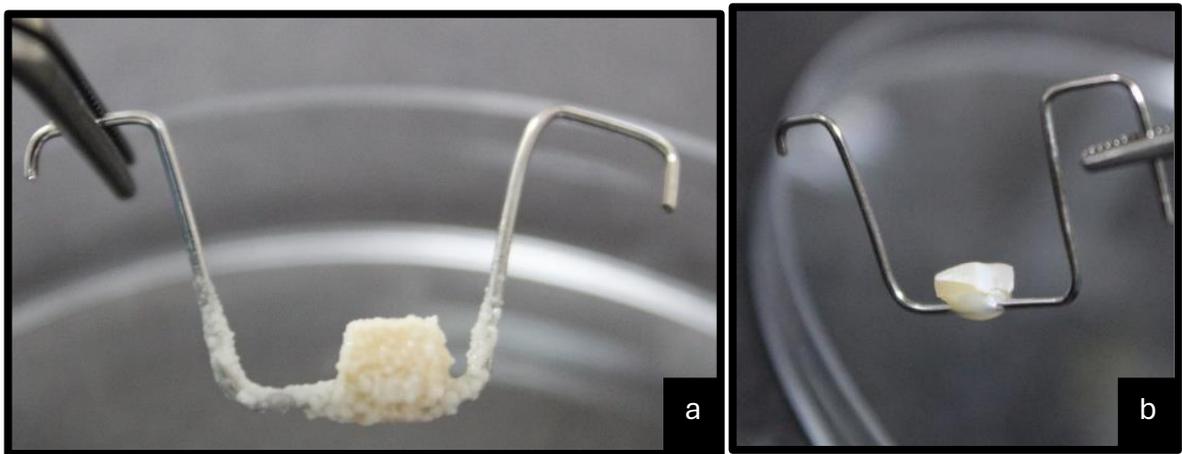
Para determinar los cambios en el pH de las placas, se midió el pH del caldo *BHI* de cada placa con un pH metro (figura 7). Las mediciones se realizaron una vez al día, al iniciar la jornada, en el caldo desechado dentro de un vaso de precipitado (un vaso por placa), previamente esterilizado por exposición UV durante 30 minutos.



**Figura 7. Medidor de pH de sobremesa Orion Star™ A211 (Thermo Scientific™).**

### 6.11. Recolección y almacenamiento de muestras

Una vez finalizado el modelo experimental, se removió cada una de las muestras de su armazón, luego fueron lavadas de manera manual utilizando gluconato de clorhexidina al 0.12% y cepillo de dientes suave para eliminar los residuos de biopelícula (Figura 8). Finalizada la limpieza, las muestras se almacenaron en tubos de minicentrífuga (Eppendorf®) con agua destilada estéril a 4°C para su posterior evaluación.



**Figura 8. Muestra de bloque de esmalte en armazón. a)** Formación de biopelícula sobre las muestras una vez finalizado el experimento. **b)** muestras tras la remoción de la biopelícula.

### 6.12. Evaluación de la microdureza superficial de Vickers

Se midió la microdureza superficial de cada bloque de esmalte por medio de una microindentación de diamante (Figura 9), con una carga de 200g (1,961N) aplicados durante 15 segundos. Se aseguró cada bloque de esmalte con un cubo de cera amarilla de aproximadamente 5mm x 5mm x 5mm y luego se montó en la plataforma del microdurómetro (Figura 10) para el ensayo de microdureza. Se analizaron 3 muescas por muestras, en el centro y en cada uno de los extremos dentro de un mismo eje de la superficie del bloque de esmalte, obteniendo un

promedio de dureza por cada bloque de esmalte. Los valores de dureza fueron calculados por el equipo, usando la ecuación para el ensayo de dureza de Vickers.



**Figura 9. Microindentadura en bloque de esmalte.** Realizado para la medición de dureza del esmalte de la muestra.



**Figura 10. Microdurómetro Duramin de Struers®.** Proporcionado por la facultad de ciencias físicas y matemáticas de la Universidad de Chile.

### 6.13. Análisis estadístico

Los datos fueron ingresados a una base de datos por un solo operador en archivo Excel Office para Windows.

La evaluación de la distribución de las muestras se realizó mediante el test Shapiro-Wilk.

Para la comparación de las medias se utilizó el test de análisis de la varianza ANOVA y de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si el valor de  $p < 0,05$ .

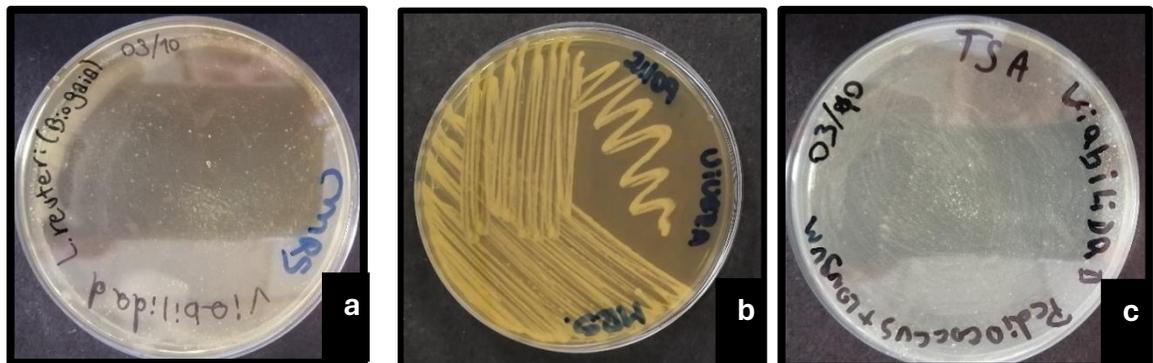
## 7. RESULTADOS

### 7.1. Controles internos

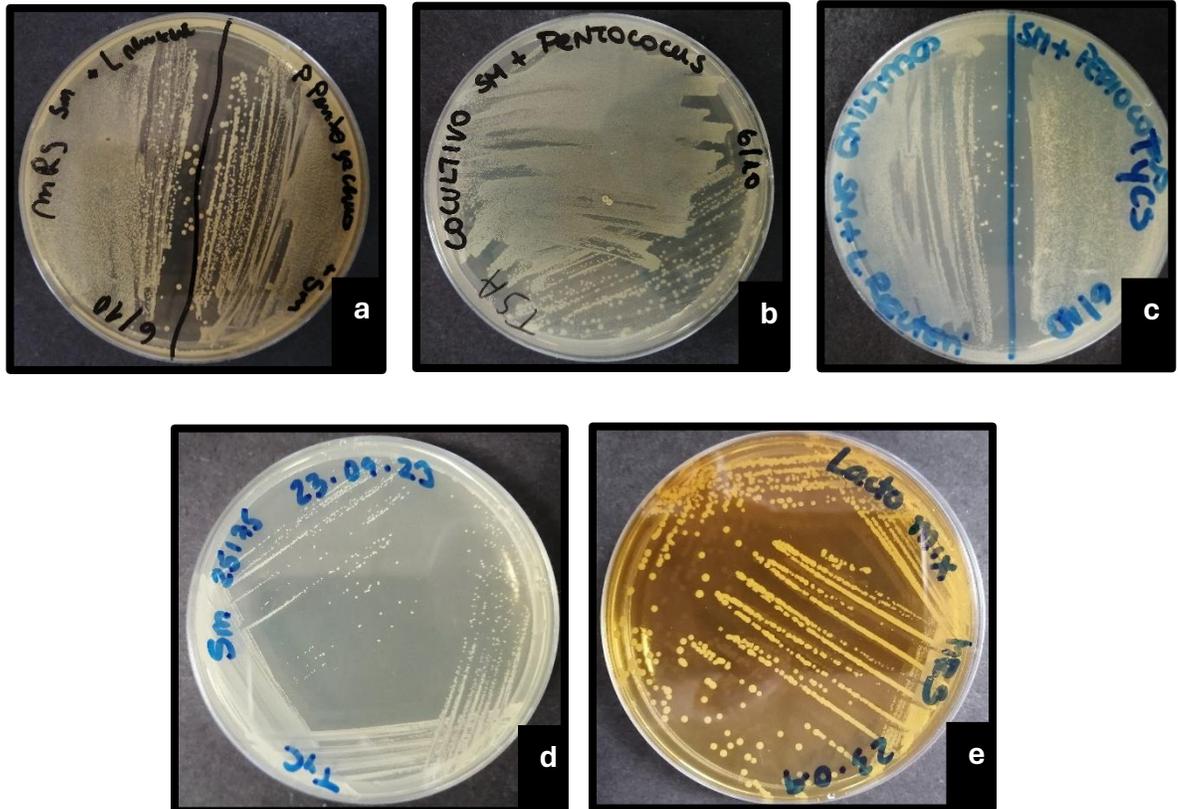
Previo al inicio de la estrategia experimental para este estudio se realizaron ensayos de viabilidad y de co-cultivo, para demostrar que los probióticos utilizados en el experimento tuviesen la capacidad de crecer en un mismo medio de cultivo junto a *S. mutans*. Así también, se realizaron controles de pureza de los pocillos para corroborar que no se hubiesen contaminado durante el desarrollo de los experimentos microbiológicos.

#### 7.1.1. Estudios de viabilidad y co-cultivo

Para los estudios de viabilidad (Figura 11) y co-cultivo (Figura 12), luego del periodo de incubación de los probióticos, se observó crecimiento de colonias bacterianas.



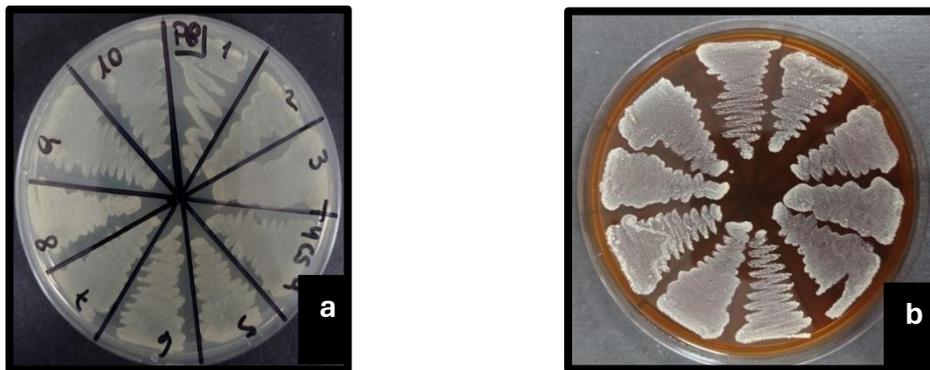
**Figura 11. Siembra de probióticos.** a) Biogaia® (*L. reuteri*) en placa en agar MRS, b) Vivera® (LGG) en agar MRS y c) Multiflora® (*P. pentosaceuss* con *B. longum*) en TSA.



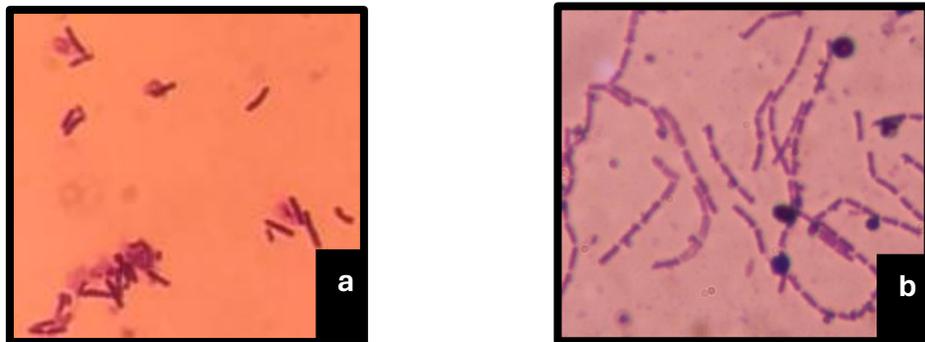
**Figura 12. Siembra de co-cultivos.** a) placa con agar MRS, siembra de *S. mutans* + *L. reuteri* por la mitad izquierda y de *S. mutans* + *P. pentosaceuss* con *B. longum* por la mitad derecha. b) placa en medio TSA, siembra de *S. mutans* + *P. pentosaceuss* con *B. longum*. c) placa con agar TYCS, siembra de *S. mutans* + *L. reuteri* por la mitad izquierda y de *S. mutans* + *P. pentosaceuss* con *B. longum* por la mitad derecha. d) placa con agar TYCS, siembra de *S. mutans* + LGG. e) placa con agar MRS, siembra de *S. mutans* + *L. rhamnosus* GG.

### 7.1.2. Control de pureza de pocillos

Se observó crecimiento bacteriano tras 24 horas de incubación de la siembra de los pocillos de cada placa. La figura 13 muestra algunos ejemplos del control diario. Además, mediante microscopia, utilizando el microscopio Axiostar Plus de ZEISS®, se corroboró la respectiva morfología celular, agrupación y tipo de pared de las cepas ensayadas. La figura 14 muestra algunos ejemplos.



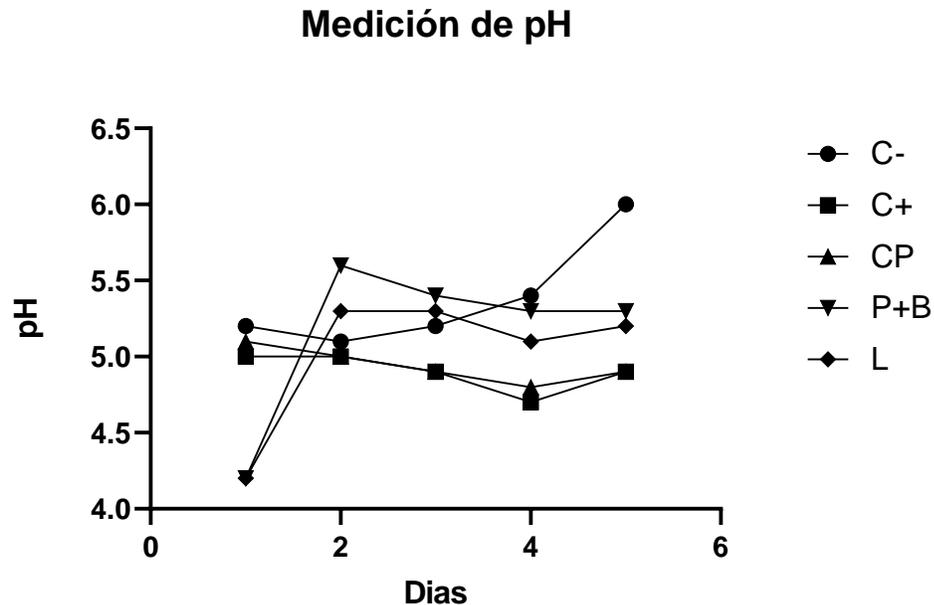
**Figura 13. Ejemplo de los controles de las placas.** a) control para *S. mutans* en agar TYCS. b) control para *L. reuteri* en agar MRS.



**Figura 14. Frotis y tinción Gram visto bajo microscopio aumento x100.** a) muestra de placa de grupo con probiótico *L. reuteri*. b) muestra de placa de grupo con probiótico LGG.

## 7.2. Evaluación de pH

Se midió el pH del caldo de cada una de las placas durante los 5 días que duró la exposición (Figura 15).



**Figura 15. Cálculo de pH del caldo de cada grupo.** Distribución del pH medido con pH metro en los 5 días del experimento de cada placa. C- = Control negativo, C+ = Control positivo, CP = Control probiótico *LGG*, P+B = *P. pentosaceus* con *B. longum*, L = *L. reuteri*.

## 7.3. Determinación de la microdureza

Las muestras fueron separadas según grupos; sin exposición a sacarosa como control negativo (C-), expuestas a sacarosa como control positivo (C+), expuestas a sacarosa/probiótico *LGG* como control probiótico (CP), expuestas a sacarosa/probiótico de *P. pentocaseus* con *B. longum* (P+B) y expuestas a sacarosa/probióticos de *L. reuteri* (L). Hubo pérdida de 1 muestra del grupo CP.

Los resultados del promedio de microdureza, las desviaciones estándar y los intervalos de confianza de cada grupo son representados en la tabla 4. La muestra que arrojó el valor de microdureza más alto pertenece al grupo de muestras P+B (HV de 262,7) y la muestra que arrojó el menor registro de microdureza pertenece

al grupo de muestras C+ (HV de 102,0). El grupo C- es el que presenta el promedio más alto de microdureza superficial, seguido del grupo expuesto a sacarosa/probiótico *L. reuteri*.

<b>Grupos</b>	<b>Promedio microdureza de Vickers (HV)</b>	<b>Intervalo de confianza</b>
<b>Control negativo</b>	174,5	143,4 - 205,5
<b>Control positivo</b>	128,4	116,7 - 140,1
<b>Control probiótico</b>	151,1	133,7 - 168,6
<b><i>P. pentosaceus + B longum</i></b>	150,1	115,8 - 184,4
<b><i>L. reuteri</i></b>	152,2	129,9 - 174,5

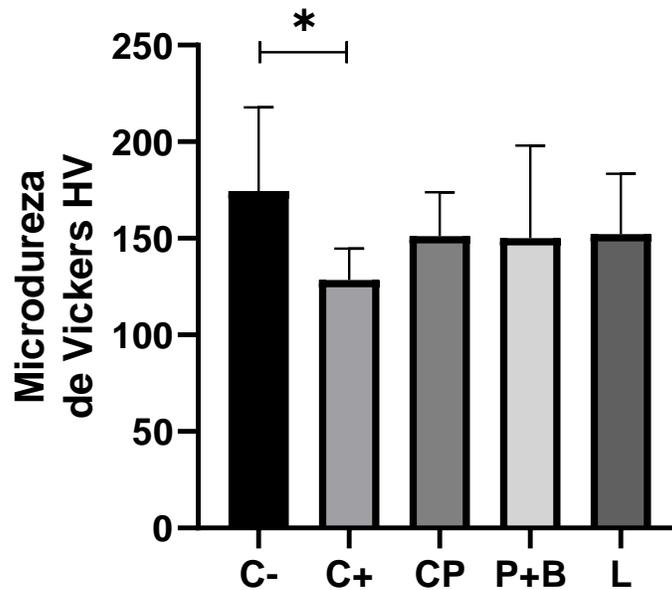
**Tabla 4. Promedios de microdureza y los intervalos de confianza.**

#### 7.4. Comparación de la microdureza

Al comparar los promedios para cada grupo de muestras mediante análisis de prueba estadístico de Bonferroni, se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre los grupos C- y C+, con un valor p de 0,048 y una diferencia de 46,1HV (Figura 16). Sin embargo, entre los grupos C- y CP, C- y P+B y C- y L no se observó diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ), las diferencias obtenidas fueron de 23,4HV, 24,4HV y de 22,3HV respectivamente.

Del mismo modo, entre los grupos C+ y CP, C+ y P+B y C+ y L no se observó diferencias estadísticamente significativas, las diferencias obtenidas fueron de 22,7HV, 21,7HV y 23,8HV respectivamente. También, entre los grupos CP y P+B,

CP y L y P+B y L las diferencias obtenidas fueron de 1,0HV, 1,1HV y de 2,1HV respectivamente, sin evidenciar significancia estadística entre ellos.



**Figura 16. Microdureza en esmalte.** Comparación de los niveles de microdureza de Vickers en esmalte entre los grupos C- y C+. Los resultados se presentan como el promedio y desviación estándar. Se consideró significancia estadística con  $p < 0,05$ . ns= No significativo, C- = Control negativo, C+ = Control positivo, CP = Control probiótico *LGG*, P+B = *P. pentosaceus* con *B. longum*, L = *L. reuteri*.

## 8. DISCUSIÓN

En el desarrollo de este estudio, se expusieron bloques de esmalte a una desmineralización mediada por *S. mutans* en un modelo de caries *in vitro*, en el que se agregaron los probióticos *L. reuteri* y una mezcla de *P. pentosaceus* con *B. longum*, para observar su efecto en la microdureza del esmalte dental, en comparación con bloques que no fueron tratados con los probióticos propuestos.

La medición de la microdureza superficial del esmalte proporciona una importante y objetiva información sobre el grado de mineralización de la estructura dental, también actúa como indicador de presencia de caries (Featherstone, J. y cols. 1983). Los resultados de microdureza de la superficie del esmalte, mostraron un valor similar entre los grupos tratados con probióticos *L. reuteri*, la mezcla de *P. pentosaceus* con *B. longum*, y el control probiótico.

En estudios previos donde se evaluó mediante microdureza el efecto inhibitor del probiótico *L. rhamnosus SP1* sobre la desmineralización del esmalte en un modelo *in situ*, se observó que *L. rhamnosus SP1* reduce la desmineralización al compararlo con un grupo que solo fue expuesto a sacarosa. (Azán, 2019; Colil, 2019; Naveillan, 2020).

En otros estudios donde se evaluó la capacidad de probióticos *Lactobacillus spp* para inhibir la actividad metabólica de *S. mutans*, se observaron resultados favorables para los probióticos. A su vez, se ha reportado que *Bifidobacterium spp* posee un efecto inhibitorio sobre la formación de biopelícula de *S. mutans*. (Söderling, E. y cols. 2010; Fernández, C. y cols. 2016; Schwendicke, F. y cols 2017)

En los resultados de este trabajo, no se observó diferencia significativa entre ninguno de los grupos probióticos ( $p > 0,05$ ), Incluso, sus promedios resultaron ser semejantes entre ellos, tendiendo todos a un promedio mayor al control positivo.

En el caso de LGG se puede deber a la producción de sustancias antimicrobianas tipo bacteriocinas que inhiben el crecimiento de *S. mutans* o bien a la competencia por nutrientes en el medio (Söderling, E. y cols. 2010; Rose, R. 2000). Además, se

ha observado que *L. rhamnosus* puede inhibir la formación de biopelículas orales al disminuir la producción de glucano de *S. mutans* (Lee, S. y Kim Y. 2014)

En otros estudios, se reporta que *L. reuteri* genera una sustancia llamada reuterin, esta sustancia logra inhibir el crecimiento de algunas bacterias, y se ha demostrado que producida en óptimas condiciones tiene el potencial de inhibir el crecimiento de *S. mutans* (Söderling, E. y cols. 2010), también posee actividad antimicrobiana debido a la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kang MS. y cols. 2011). A su vez se ha demostrado que *Lactobacillus spp*, dentro de ellos *L. reuteri*, son capaces de disminuir la adhesión de bacterias cariogénicas al modificar la composición proteica de la película salival (Haukioja, A. y cols. 2008).

La mezcla de *P. pentosaceus* con *B. longum* al ser investigados como probióticos independientes, se ha observado que *P. pentosaceus* tiene el potencial de inhibir la actividad cariogénica de *S. mutans* por lo que es un candidato ideal como probiótico para prevenir la enfermedad de caries dental (Luan, C. y cols. 2022). En el caso de *B. longum* se observó en un modelo *in vitro* de película salival sobre hidroxiapatita, que las cepas de *S. mutans* y *S. gordonii* después de estar en contacto con *B. longum*, éste interfirió con la adhesión de dichas bacterias (Haukioja, A. y cols. 2008).

En cuanto al uso combinado entre *P. pentosaceus* y *B. longum*, se ha demostrado que esta mezcla posee la capacidad de inhibir el crecimiento de enterobacterias oportunistas de los géneros *Escherichia* y *Klebsiella*, relacionados con el cólico infantil (Chen, K. y cols. 2021). También, en el trabajo realizado por Erola y colaboradores, proporciona evidencia de las propiedades probióticas y sinérgicas de *B. longum* y *P. pentosaceus*, y de su potencial para tratar los trastornos gastrointestinales funcionales pediátricos (Astó, E. y cols. 2021). Sin embargo, no se encontró dentro de la evidencia disponible durante la realización de esta investigación, información respecto al uso de ambos probióticos en conjunto para la prevención de caries. Aun así, no se descarta un posible efecto de esta combinación sobre la biopelícula oral. Se sugieren más estudios para lograr identificar su efecto y mecanismo.

La evidencia disponible sobre el uso de probióticos comerciales para el manejo de caries, es numerosa y al mismo tiempo contradictoria. Es así como, en el estudio realizado por Cildir y colaboradores, se evaluó en una población infantil la reducción del recuento de *S. mutans* en saliva, luego de la administración del probiótico *L. reuteri* en gotas. Los autores reportan no haber evidenciado diferencia significativa entre el grupo experimental y el placebo (Cildir, S. y cols. 2012). De igual modo, en un estudio realizado en una población sometida a un tratamiento de ortodoncia fija, a quienes se les indicó ingerir 5 gotas al día del probiótico *L. reuteri* durante 21 días. No se reportó según los autores diferencia estadísticamente significativa entre el grupo experimental y el placebo (Alforaidi, S. y cols. 2021). Por otra parte, existen estudios donde se evaluó la diferencia en el recuento de *S. mutans* en saliva, antes y después de la terapia con probióticos comerciales, evidenciando una disminución en el recuento de *S. mutans* luego de haber sido aplicada la terapia probiótica. (Jindal, G. y cols. 2011; Yousuf, A. y cols. 2015; Alp, S. y cols. 2018).

A pesar de que en los grupos probióticos se observó una dureza superficial promedio mayor, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre estos y el control positivo ( $p > 0,05$ ). Esto podría ser en parte porque los probióticos usados en el estudio, son productores de desechos ácidos como el ácido láctico. Saha y colaboradores, en un estudio *in vitro* realizado el 2023 nos advierte sobre la capacidad de algunos probióticos, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum* y *Saccharomyces boulardii*, de producir y mantener un medio ácido, logrando a su vez una disminución en la micro dureza superficial del esmalte. (Saha, S. y cols. 2023). Sin embargo, la literatura recopilada en esta investigación sugiere lo contrario. Estos probióticos compiten por nutrientes y modifican la patogenicidad de bacterias cariogénicas. Aun así, no se debe descartar o pasar por alto las propiedades acidogénicas y acidúricas que poseen los probióticos formadores de ácido láctico, como los empleados en la presente investigación (Söderling, E. y cols. 2010). Posiblemente es esa capacidad formadora de ácido lo que nos ayudaría a explicar por qué no existe diferencia significativa entre los grupos probióticos y el control positivo.

Los modelos *in vitro* nos muestran una situación altamente controlada, aplica una gran versatilidad y alto nivel de control de los modelos de laboratorio en menor tiempo y menor variabilidad con respecto a los ensayos clínicos. Dentro de los protocolos de estudio de caries *in vitro*, el modelo de caries microbiológico entrega grandes beneficios (Bennett, T. y cols. 2019). Entre ellos destacan en esta investigación la evaluación de las propiedades cariogénicas de la biopelícula como el pH y la evaluación de la microdureza de los tejidos duros del diente. El modelo propuesto por Ccahuana-Vasquez y Cury, presenta ciertas ventajas por sobre otros modelos de biopelícula estáticos, entre los que se destacan que; permite el uso de cortes de esmalte o dentina para la evaluación de la pérdida mineral, la exposición de azúcar es intermitente para poder imitar los ciclos de “festín y hambruna” a los se expone normalmente la cavidad oral, ayudando a tener un mejor estimado sobre las propiedades de la biopelícula, utiliza un diseño de suspensión del sustrato, lo que permite una verdadera adhesión de las bacterias durante las primeras fases de la formación de la biopelícula, permite determinar el pH del medio (indicador de una biopelícula acidogénica), permite determinar la concentración de calcio liberado (indicador de pérdida de minerales) y permite determinar la cantidad de productos metabólicos bacterianos en el medio de cultivo, aunque las últimas dos no fueron realizadas en este estudio (Bennett, T. y cols. 2019).

Se han llevado a cabo múltiples estudios *in vitro*, *in vivo* e *in situ* sobre cepas bacterianas para el uso como probióticos en salud oral, en donde se evalúan parámetros como; producción de ácido, toxicidad, resistencia a antibióticos, capacidad de agregación, capacidad de producción de compuestos volátiles que podrían generar mal olor, capacidad de adherencia a tejidos orales, y cariogenicidad (Bosch M. y cols 2012). Si bien, aun no existe un protocolo claro sobre su uso, López y colaboradores nos indican que *Lactobacillus spp* como probiótico para el manejo de la enfermedad de caries es el género que ha sido más ampliamente estudiado *in vitro*, presentando propiedades de inhibición de adhesión y del crecimiento de cepas cariogénicas (López, Y. y cols. 2023).

Este estudio nos entrega evidencia que sugiere que los probióticos comerciales podrían tener un efecto de reducción de la desmineralización del esmalte dental

en un modelo de caries *in vitro* mediado por bacterias. Sin embargo, no existe diferencia significativa en los resultados. Además, para este estudio se utilizaron las dosis recomendadas por el fabricante, dosis que han sido calculadas para su uso a nivel gastrointestinal, por lo que existe la posibilidad que se necesiten administrar dosis más altas al modelo experimental para lograr un mejor desempeño de los probióticos, por lo tanto, se sugiere realizar investigaciones posteriores para definir la dosis necesaria para un efecto beneficioso sobre el esmalte dental. También, se recomienda realizar un análisis de *micro CT*, para evaluar la densidad mineral de las muestras en los grupos controles y los grupos probióticos, este método ayudaría a cuantificar de manera más objetiva los cambios de contenido mineral en el esmalte dental. A su vez el uso de un mayor número de muestras ayudaría a generar datos más representativos. Igualmente, se debe hacer mención que se utilizó un medio oleoso como vehículo para la administración de los probióticos *L. reuteri* y la mezcla de *P. pentosaceus* con *B. longum*, lo que impidió una mezcla homogénea entre el probiótico y el medio de cultivo empleado para el desarrollo de las bacterias en esta investigación.

Los resultados sugieren que la aplicación de probióticos *Limosilactobacillus reuteri* y el uso conjunto de *Pediococcus pentosaceus* con *Bifidobacterium longum* sobre el esmalte dental sometido a sacarosa, evidencian un efecto protector parcial sin presentar una diferencia estadísticamente significativa.

## 9. CONCLUSIONES

Los valores en los promedios de microdureza de las muestras de bloques de esmalte expuestas a sacarosa y a los probióticos *Limosilactobacillus reuteri* y la mezcla de *Pediococcus pentosaceus* con *Bifidobacterium longum* en un modelo de caries *in vitro* monoespecie de *S. mutans*, tienden a ser mayores en comparación con el control positivo y similar al control probiótico. Sin embargo, no se observan diferencias significativas entre los grupos probióticos y el control positivo.

Este estudio no descarta la posibilidad que otro probiótico disponible en el comercio podría ejercer un efecto mayor al observado, sugiriendo de este modo,

continuar con esta línea investigativa utilizando otras cepas probióticas, probando diferentes dosis, y complementando con el análisis de *micro CT*.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahola, A., Yli-Knuutila, H., Suomalainen, T., Poussa, T., Ahlström, A., Meurman, J., y Korpela, R. (2002). Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Archives of Oral Biology*, 47(11), 799–804. [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(02\)00112-7](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(02)00112-7)

Alforaidi, S., Bresin, A., Almosa, N., Lehrkinder, A., y Lingström, P. (2021). Effect of drops containing *Lactobacillus reuteri* (DSM 17938 and ATCC PTA 5289) on plaque acidogenicity and other caries-related variables in orthodontic patients. *BMC Microbiology*, 21(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02310-2>

Alp, S., y Baka, Z. (2018). Effects of probiotics on salivary *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* levels in orthodontic patients. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*, 154(4), 517–523. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2018.01.010>

Amaechi, B., Tenuta, L., Ricomini, A., y Cury, J. (2019). Protocols to Study Dental Caries *In Vitro*: Microbial Caries Models. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1922, 357–368. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9012-2\\_32](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9012-2_32)

Ancy, D., y Dhaded, N. (2021). Biofilm: An emergent form of bacterial life-a review. *IP Indian Journal of Conservative and Endodontics*, 6(2), 92–96. <https://doi.org/10.18231/j.ijce.2021.021>

Asamblea General De Las Naciones Unidas. (2011). Declaración Política de la Reunión de Alto Nivel de la Asamblea General sobre la Prevención y el Control de las Enfermedades No Transmisibles. Declaración Política de La Reunión de Alto Nivel de La Asamblea General de Las Naciones Unidas Sobre La Prevención y El Control de Las Enfermedades No Transmisibles, 49780, 1–14.

Ashwin, D., Vijayaprasad, K., Taranath, M., Ramagoni, N., Nara, A., y Sarpangala, M. (2015). Effect of probiotic containing ice-cream on salivary mutans streptococci (SMS) levels in children of 6-12 years of age: A randomized controlled double blind

study with six-months follow up. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(2), ZC06–ZC09. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/10942.5532>

Azán, N. J. (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 y P. Palma Fluxá. Eds.)

Ben, F., Kouidhi, B., Fdhila, K., Elabed, H., Ben, R., Mahdouani, K., Bakhrouf, A., y Chaieb, K. (2016). Microbial Pathogenesis Anti-bacterial and anti-biofilm activity of probiotic bacteria against oral pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 97, 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.06.018>

Bosch, M., Nart, J., Audivert, S., Bonachera, M. A., Alemany, A. S., Fuentes, M. C., y Cuñé, J. (2012). Isolation and characterization of probiotic strains for improving oral health. *Archives of Oral Biology*, 57(5), 539–549. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.10.006>

Brubaker, L., y Wolfe, A. (2017). The female urinary microbiota, urinary health and common urinary disorders. *Annals of Translational Medicine*, 5(2), 1–7. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.11.62>

Caglar, E., Kavaloglu, S., Ergeneli, S., Sandalli, N., Twetman, S. (2006). Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets. *Acta Odontol Scand* 64:314–318

Campus, G., Cocco, F., Carta, G., Cagetti, M. G., Simark-Mattson, C., Strohmenger, L., y Lingström, P. (2014). Effect of a daily dose of *Lactobacillus brevis* CD2 lozenges in high caries risk schoolchildren. *Clinical Oral Investigations*, 18(2), 555–561. <https://doi.org/10.1007/s00784-013-0980-9>

Chen, F., y Wang, D. (2010). Novel technologies for the prevention and treatment of dental caries: A patent survey. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 20(5), 681–694. <https://doi.org/10.1517/13543771003720491>

Chen, K., Liu, C., Li, H., Lei, Y., Zeng, C., Xu, S., Li, J., y Savino, F. (2021). Infantile Colic Treated With *Bifidobacterium longum* CECT7894 and *Pediococcus pentosaceus* CECT8330: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial.

Frontiers in Pediatrics, 9(September), 1–9.  
<https://doi.org/10.3389/fped.2021.635176>

Chow, A., Hao, y., y Yang, X. (2010). Molecular characterization of human homologs of yeast MOB1. *International Journal of Cancer*, 126(9), 2079–2089.  
<https://doi.org/10.1002/ijc.24878>

Cildir, S., Sandalli, N., Nazli, S., Alp, S., y Caglar, E. (2012). A Novel Delivery System of Probiotic Drop and Its Effect on Dental Caries Risk Factors in Cleft Lip/Palate Children. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 49(3), 369–372.  
doi:10.1597/10-035

Coenye, T., Honraet, K., Rigole, P., Jimenez, P., y Nelis, H. (2007). *In vitro* inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation on hydroxyapatite by subinhibitory concentrations of anthraquinones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), 1541–1544. <https://doi.org/10.1128/AAC.00999-06>

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

Coqueiro, A., Bonvini, A., Raizel, R., Tirapegui, J., y Rogero, M. (2018). Probiotic supplementation in dental caries: is it possible to replace conventional treatment? *Nutrire*, 43(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s41110-018-0064-3>

Duarte, I. (2015). Análisis de salud oral y su impacto en la calidad de vida de la población preescolar del municipio de Cascais, Portugal, en. Tesis Doctoral. Sevilla: Facultad de odontología de la Universidad de Sevilla

Featherstone JD (1983). Diffusion phenomena and enamel caries development. In: *Cariology today*. Int. Congr., 1984. Zürich: Karger.

Fejerskov, O. (2004). Changing paradigms in concepts on dental caries: Consequences for oral health care. *Caries Research*, 38(3), 182–191.  
<https://doi.org/10.1159/000077753>

Fernández, C., Giacaman, R., Tenuta, L., y Cury, J. (2015). Effect of the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* LB21 on the Cariogenicity of *Streptococcus mutans*

UA159 in a Dual-Species Biofilm Model. *Caries Research*, 49(6), 583–590. <https://doi.org/10.1159/000439315>

Fina, B., Lombarte, M., y Rigalli, A. (2013). Investigación de un fenómeno natural: ¿Estudios *in vivo*, *in vitro* o *in silico*? *Actualizaciones En Osteología*, 9(3), 294–299.

Flichy-Fernández, A. J., Alegre-Domingo, T., Peñarrocha-Oltra, D., y Peñarrocha-Diago, M. (2010). Probiotic treatment in the oral cavity: An update. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 15(5), 677–680. <https://doi.org/10.4317/medoral.15.e677>

Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), 365–378.

Garcia-Hernandez, Y., Perez-Sanchez, T., Garcia-Curbelo, Y., Sosa-Cossio, D., y Nicoli, J. (2017). Growth ability, microbial activity and susceptibility to antimicrobials of two strains of *Pediococcus pentosaceus*, candidates to probiotic. *Cuban Journal of Agriculturañ Sscience* , 51(4), 433–442.

Giacaman, R., Fernandez, C., Muñoz-Sandoval, C., y León, S. (2021). Understanding dental caries as a non-communicable disease. *Frontiers in Oral Health*, 231(12), 749–753. <https://doi.org/10.1038/s41415-021-3775-4>

Global Burden of Disease Study 2017. (2017).

Goyal, N., Shamanna, P., Varughese, S., Abraham, R., Antony, B., Emmatty, R., y Paul, P. (2019). Effects of amine fluoride and probiotic mouthwash on levels of *Porphyromonas gingivalis* in orthodontic patients: A randomized controlled trial. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 23(4), 339–344. [https://doi.org/10.4103/jisp.jisp\\_551\\_18](https://doi.org/10.4103/jisp.jisp_551_18)

Haukioja, A., Loimaranta, V., y Tenovuo, J. (2008). Probiotic bacteria affect the composition of salivary pellicle and streptococcal adhesion *in vitro*. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(4), 336–343. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2008.00435.x>

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

Jain, N., Dutt, U., Radenkov, I. y Jain, S. (2023). WHO's global oral health status report 2022: Actions, discussion and implementation. *Oral Dis.* <https://doi.org/10.1111/odi.14516>

Jalasvuori, H., Haukioja, A., y Tenovu, J. (2012). Probiotic *Lactobacillus reuteri* strains ATCC PTA 5289 and ATCC 55730 differ in their cariogenic properties *in vitro*. *Archives of Oral Biology*, 57(12), 1633–1638. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.07.014>

James, S., Abate, D., Abate, K., Abay, S., Abbafati, C., Abbasi, N., Abbastabar, H., Abd-Allah, F., Abdela, J., Abdelalim, A., Abdollahpour, I., Abdulkader, R. S., Abebe, Z., Abera, S., Abil, O., Abraha, H., Abu-Raddad, L., Abu-Rmeileh, N., Accrombessi, M., Murray, C. (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)

Jepsen, S., Blanco, J., Buchalla, W., Carvalho, J. C., Dietrich, T., Dörfer, C., Eaton, K. A., Figuero, E., Frencken, J. E., Graziani, F., Higham, S. M., Kocher, T., Maltz, M., Ortiz-Vigon, A., Schmoeckel, J., Sculean, A., Tenuta, L. M., van der Veen, M. H., y Machiulskiene, V. (2017). Prevention and control of dental caries and periodontal diseases at individual and population level: consensus report of group 3 of joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *Journal of clinical periodontology*, 44 Suppl 18, S85–S93. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12687>

Jindal, G., Pandey, R., Agarwal, J., y Singh, M. (2011). A comparative evaluation of probiotics on salivary mutans streptococci counts in Indian children. *European Archives of Paediatric Dentistry*, 12(4), 211–215. <https://doi.org/10.1007/BF03262809>

Juneja, A., y Kakade, A. (2012). Evaluating the effect of probiotic containing milk on salivary mutans streptococci levels. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 37(1), 9–14. <https://doi.org/10.17796/jcpd.37.1.tq91178m7w876644>

Kang, M., Oh, J., Lee, H., Lim, H., Lee, S., Yang, K., Choi, N., y Kim, S. (2011). Inhibitory effect of *Lactobacillus reuteri* on periodontopathic and cariogenic bacteria. *Journal of Microbiology*, 49(2), 193–199. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-0252-9>

Kilian, M., Chapple, I., Hannig, M., Marsh, P., Meuric, V., Pedersen, A., Tonetti, M., Wade, W., y Zaura, E. (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>

Koo, H., Hayacibara, M., Schobel, B., Cury, J., Rosalen, P., Park, Y., Vacca-Smith, A., y Bowen, W. (2003). Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(5), 782–789. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg449>

Laleman, I., Dettailleux, V., Slot, D., Slomka, V., Quirynen, M., y Teughels, W. (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, S., y Kim, Y. (2014). A comparative study of the effect of probiotics on cariogenic biofilm model for preventing dental caries. *Archives of Microbiology*, 196(8), 601–609. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-0998-7>

Lele, V., Zelvyte, R., Monkeviciene, I., Kantautaite, J., Stankevicius, R., Ruzauskas, M., Sederevicius, A., Antanaitis, R., y Bartkiene, E. (2019). Milk production and ruminal parameters of dairy cows fed diets containing *Lactobacillus sakei* KTU05-6 and *Pediococcus pentosaceus* BaltBio02. *Polish journal of veterinary sciences*, 22(2), 327–335. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2019.129224>

Lin, Y., Chou, C., y Hsu, S. (2017). Effects of *Lactobacillus casei* Shirota intake on caries risk in children. *Journal of Dental Sciences*, 12(2), 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2016.09.005>

Litvak, Y., y Bäumler, A. (2019). Microbiota-Nourishing Immunity: A Guide to Understanding Our Microbial Self. *Immunity*, 51(2), 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.08.003>

Lorian, V., y Satta, G. (1988). Differences between *in vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(10), 1600–1601. <https://doi.org/10.1128/AAC.32.10.1600>

Luan, C., Jiang, N., Zhou, X., Zhang, C., Zhao, Y., Li, Z., y Li, C. (2022). Antibacterial and anti-biofilm activities of probiotic *Lactobacillus curvatus* BSF206 and *Pediococcus pentosaceus* AC1-2 against *Streptococcus mutans*. *Microbial pathogenesis*, 164, 105446. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105446>

Luckey, T. D. (1972). Introduction to intestinal microecology. *Am. J. Clin. Nutr* 25, 1292–1294

Lynch, S, Dixon, L., Benoit, M., Brodie, E., Keyhan, M., Hu, P., Ackerley, D., Andersen, G., y Matin, A. (2007). Role of the *rapA* gene in controlling antibiotic resistance of *Escherichia coli* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), 3650–3658. <https://doi.org/10.1128/AAC.00601-07>

MacHiulskiene, V., Campus, G., Carvalho, J., Dige, I., Ekstrand, K., Jablonski-Momeni, A., Maltz, M., Manton, D., Martignon, S., Martinez-Mier, E., Pitts, N., Schulte, A., Splieth, C., Tenuta, L., Ferreira, A., y Nyvad, B. (2020). Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Research*, 54(1), 7–14. <https://doi.org/10.1159/000503309>

Manderson, L., y Jewett, S. (2023). Risk, lifestyle and non-communicable diseases of poverty. *Globalization and Health*, 19(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12992-023-00914-z>

Marsh, P. (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>

Acuña, M., Tay-chu-jon, Y., y Delgado, I. (2021) In situ models to evaluate erosive potential of beverages. *Int. J. Odontostomat.*, 15(3):788-794.

Ministerio de Salud. (2021). Plan Nacional de Salud Bucal 2021-2030. Subsecretaría de Salud Pública.

Ministerio de Salud. (2013). Orientaciones para el logro de las metas de salud bucal. ENS 2011-2020.

Mishra, S., Rath, S., y Mohanty, N. (2020). Probiotics—A complete oral healthcare package. *Journal of Integrative Medicine*, 18(6), 462–469. <https://doi.org/10.1016/j.joim.2020.08.005>

Morales, A., Jara, G., Werlinger, F., Cabello, R., Espinoza, I., Giacaman, R., Lee, X., Carvajal, P., Arteaga, O., Cavalla, F., Corral, C., Baeza, M., Rodríguez, G., León, S., Gambetta, K., y Gamonal, J. (2020). Sinopsis de la Situación de Salud Oral en Chile - Parte II: Diagnósticos Poblacionales de Salud Oral. *International Journal of Interdisciplinary Dentistry*, 13(2), 88–94. <https://doi.org/10.4067/s2452-55882020000200088>

Muñoz, C., Gambetta, K., Santamaría, R., Splieth, C., Paris, S., Schwendicke, F., y Giacaman, R. (2022). ¿Cómo Intervenir el Proceso de Caries en Niños? Adaptación del Consenso de ORCA / EFCD / DGZ. How can the Caries Process in Children be intervened? Adaptation of the ORCA / EFCD / DGZ Consensus. 15(1), 48–53. <https://doi.org/10.4067/S2452-55882022000100048>

Nase, L., Hatakka, K., Savilahti, E., Saxelin, M., Pönkä, A., Poussa, T., Korpela, R., y Meurman, J. (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>

Nase, L., Hatakka, K., Savilahti, E., Saxelin, M., Pönkä, A., Poussa, T., Korpela, R., y Meurman, J. (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>

Nanasombat, S., Treebavonkusol, P., Kittirisopit, S., Jaichalad, T., Phunpruch, S., Kootmas, A., y Nualsri, I. (2017). Lactic acid bacteria isolated from raw and fermented pork products: Identification and characterization of catalase-producing *Pediococcus pentosaceus*. *Food Science and Biotechnology* 26(1), 173–179. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0023-4>

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 y G. Rodríguez Martínez Eds.)

Nikawa, H., Makihira, S., Fukushima, H., Nishimura, H., Ozaki, Y., Ishida, K., Darmawan, S., Hamada, T., Hará, K., Matsumoto, A., Takemoto, T., Aimi, R. (2004). *Lactobacillus reuteri* in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. *Int J Food Microbiol* 95:219–223

Nishihara, T., Suzuki, N., Yoneda, M., y Hirofuji, T. (2014). Effects of *Lactobacillus salivarius*-containing tablets on caries risk factors: A randomized open-label clinical trial. *BMC Oral Health*, 14(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-14-110>

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

Pan, S., Wei, H., Yuan, S., Kong, Y., Yang, H., Zhang, Y., Cui, X., Chen, W., Liu, J., y Zhang, Y. (2022). Probiotic *Pediococcus pentosaceus* ameliorates MPTP-induced oxidative stress via regulating the gut microbiota–gut–brain axis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12(November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1022879>

Paro, A., Hossain, M., Webster, T., y Su, M. (2016). Monte Carlo and analytic simulations in nanoparticle-enhanced radiation therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 4735–4741. <https://doi.org/10.2147/IJN.S107624>

Philip, N. (2019). State of the Art Enamel Remineralization Systems : The Next Frontier in Caries Management. 284–295. <https://doi.org/10.1159/000493031>

Philip, N., Suneja, B., y Walsh, L. (2018). Ecological Approaches to Dental Caries Prevention: Paradigm Shift or Shibboleth? *Caries Research*, 52(1–2), 153–165. <https://doi.org/10.1159/000484985>

Pitts, N., Twetman, S., Fisher, J., y Marsh, P. (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>

Polli, J. (2008). *In vitro* studies are sometimes better than conventional human pharmacokinetic *in vivo* studies in assessing bioequivalence of immediate-release solid oral dosage forms. *AAPS Journal*, 10(2), 289–299. <https://doi.org/10.1208/s12248-008-9027-6>

Qin, X., Zi, H., y Zeng, X. (2022). Changes in the global burden of untreated dental caries from 1990 to 2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease study. *Heliyon*, 8(9), e10714. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10714>

Rao, Y., Lingamneni, B., Reddy D. (2012). Probiotics in oral health—a review *J N J Dent Assoc*, 83 (2) (2012), pp. 28-32

Relman, D. (2012). The human microbiome: Ecosystem resilience and health. *Nutrition Reviews*, 70 (SUPPL. 1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00489.x>

Risnes, S., y Li, C. (2018). Obtaining scratch-free specimens of dental enamel prepared by sectioning, grinding, polishing, and acid etching for scanning electron microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 81(9), 997–1003. <https://doi.org/10.1002/jemt.23064>

Riverón, J., Quiñonez, J., y Fuentes, I. (2006). Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. *Revista Cubana de Estomatología*, 43(1).

Rodríguez, G., Ruiz, B., Faleiros, S., Vistoso, A., Marró, M. L., Sánchez, J., Urzúa, I., y Cabello, R. (2016). Probiotic compared with standard milk for high-caries children. *Journal of Dental Research*, 95(4), 402–407. <https://doi.org/10.1177/0022034515623935>

Rose, R. (2000). Effects of an anticariogenic casein phosphopeptide on calcium diffusion in streptococcal model dental plaques. *Archives of Oral Biology*, 45(7), 569–575. [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(00\)00017-0](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(00)00017-0)

Saha, S., Chopra, A., Kamath, S., y Kashyap, N. (2023). Can acid produced from probiotic bacteria alter the surface roughness, microhardness, and elemental composition of enamel? An *in vitro* study. *Odontology*, 111(4), 929–941. <https://doi.org/10.1007/s10266-023-00804-1>

Sandoval, F., Faleiros, S., Cabello, R., Díaz, M., Rodríguez, G., y Escobar, A. (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., Korte, F., Dörfer, C. E., Kneist, S., Fawzy El-Sayed, K., y Paris, S. (2017). Inhibition of *Streptococcus mutans* Growth and Biofilm Formation by Probiotics *in vitro*. *Caries Research*, 51(2), 87–95. <https://doi.org/10.1159/000452960>

Sender, R., Fuchs, S., y Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology*, 14(8), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>

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>

Söderling, E. M., Marttinen, A. M., y Haukioja, A. L. (2011). Probiotic Lactobacilli interfere with *Streptococcus mutans* biofilm formation in Vitro. *Current Microbiology*, 62(2), 618–622. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9752-9>

Stamatova, I., y Meurman, J. H. (2009). Probiotics: Health benefits in the mouth. *American Journal of Dentistry*, 22(6), 329–338.

Staszczyk, M., Jamka, M., Kościelniak, D., Cienkosz, B., Krzyściak, W., y Jurczak, A. (2022). Effect of a Short-Term Intervention with *Lactobacillus salivarius* Probiotic on Early Childhood Caries-An Open Label Randomized Controlled Trial. *International journal of environmental research and public health*, 19(19), 12447. <https://doi.org/10.3390/ijerph191912447>

Stecksén, 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>

Stensson, M., Koch, G., Coric, S., Abrahamsson, T. R., Jenmalm, M. C., Birkhed, D., y Wendt, L. K. (2014). Oral administration of *Lactobacillus reuteri* during the

first year of life reduces caries prevalence in the primary dentition at 9 years of age. *Caries Research*, 48(2), 111–117. <https://doi.org/10.1159/000354412>

Stillwell, A. (1964). Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms.

Talarico, T., y Dobrogosz, W. (1989). Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(5), 674–679. <https://doi.org/10.1128/AAC.33.5.674>

Ten, J., y Angmar, B. (1991). Invited Review: A Review of Quantitative Methods for Studies of Mineral Content of Intra-oral Incipient Caries Lesions. *Journal of Dental Research*, 70(1), 2–14. <https://doi.org/10.1177/00220345910700010301>

Teughels, W., Durukan, A., Ozcelik, O., Pauwels, M., Quirynen, M., y Haytac, M. C. (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>

Todorov, S., Weeks, R., Popov, I., Franco, B., y Chikindas, M. (2023). *In Vitro* Anti-*Candida albicans* Mode of Action of *Enterococcus mundtii* and *Enterococcus faecium*. *Microorganisms*, 11(3), 1–21. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030602>

Twetman, L., Larsen, U., Fiehn, N., Steckésn, C., y Twetman, S. (2009). Coaggregation between probiotic bacteria and caries-associated strains: An *in vitro* study. *Acta Odontologica Scandinavica*, 67(5), 284–288. <https://doi.org/10.1080/00016350902984237>

Yousuf, A., Nagaraj, A., Ganta, S., Sidiq, M., Pareek, S., Vishnani, P., Acharya, S., y Singh, K. (2015). Comparative Evaluation of Commercially Available Freeze Dried Powdered Probiotics on Mutans Streptococci Count: A Randomized, Double Blind, Clinical Study. *Journal of Dentistry (Tehran, Iran)*, 12(10), 729–738.

Twetman, S. (2018). Prevention of dental caries as a non-communicable disease. *European Journal of Oral Sciences*, 126, 19–25. <https://doi.org/10.1111/eos.12528>

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., Fu, J., Anne, K., Cassata, S., McCormack, S., y Gwinner, L. (1992). An improved intra-oral enamel demineralization test model for the study of dental caries. *Journal of Dental Research*, 71(Sup), 871–878. <https://doi.org/10.1177/002203459207100017>

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C., Harris, H., Mattarelli, P., O'toole, P., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G., Gänzle, M., y Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

Zommiti, M., Chikindas, M., 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>

## 11. 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.

