



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA RESTAURADORA
ÁREA DE CARIOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA**

**"Efecto del consumo de leche enriquecida con probióticos lactobacilos, en la
incidencia de lesiones de caries en niños preescolares"**

Anette Paulina Vistoso Monreal

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Rodrigo Cabello

TUTOR ASOCIADO

Prof. Dr. Gonzalo Rodríguez

**Adscrito a Proyecto FONIS SA11I2035
Santiago - Chile
2013**

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	4
MARCO TEÓRICO	5
Caries dental enfermedad crónica	5
Esquema de factores determinantes de la caries dental	6
Caries Temprana de la Infancia	7
Correlación entre <i>S. mutans</i> y CTI	8
Caries asociada a otras Bacterias orales	9
Biofilm microbiológico oral	10
Bacterioterapia	12
Probióticos	13
Mecanismo de acción de los probióticos	13
Prevalencia de caries en Chile	16
Daño por Caries en dentición temporal	17
Prevalencia de caries según edad. Chile 1992-2007	18
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
Objetivo Específico 1	20
Objetivo Específico 2	20
Objetivo Específico 3	20
METODOLOGÍA	21
Población Objetivo y Muestra	22
Técnicas de recolección de la información	24
Registro de variables confundentes	25
Coordinación de trabajo de campo	25
Plan de análisis de datos	26
RESULTADOS	27
Muestra obtenida	27
Análisis de pérdida	28
Resultados Clínicos	30
Resultado Microbiológicos	32
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	37
Referencias Bibliográficas	38
ANEXO	43

RESUMEN

La caries dental es una enfermedad crónica multifactorial que afecta a niños y adultos, tanto a la dentición temporal como a la definitiva. Es un problema de salud pública y es considerada como la enfermedad crónica más prevalente en niños. Es producida por la interacción de diversos factores, como las bacterias presentes en el biofilm, una alta dieta en hidratos de carbono, y factores del huésped, como las características de los dientes y de la saliva. Todo esto influido por las condiciones de vida de las personas que se conocen como los determinantes sociales de la salud. La caries dental en el grupo de preescolares se presenta generalmente en una forma particular denominada Caries Temprana de la Infancia (CTI), asociada a la presencia de *Streptococcus mutans* en el biofilm. Los probióticos son microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios al huésped. Estudios *in vitro* y clínicos apoyan la idea de que las bacterias probióticas tienen efectos protectores en la salud oral y que una ingesta regular de ellos disminuye el número de streptococci cariogénicos en saliva. Por lo que al administrar especies como *Lactobacillus rhamnosus* en vehículos lácteos disminuirían los niveles de *Mutans Streptococci* (*Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*) salivales en niños a corto plazo. El objetivo de este estudio es establecer si existen diferencias, en la prevalencia e incidencia de nuevas lesiones de caries, entre preescolares que consumen leche enriquecida con *Lactobacillus rhamnosus* LRH08 (probiótico) y aquellos que consumen leche sin probióticos, determinando la prevalencia e incidencia de caries a través del índice ceod al inicio y a los 12 meses del estudio. A este ensayo clínico controlado randomizado por conglomerados triple ciego de 18 meses de duración, se invitaron a participar a 520 preescolares entre 2 y 3 años de edad, que asistían a jardines infantiles de la Fundación INTEGRAL. Se conformaron los grupos experimental y control, previo consentimiento informado de los apoderados. Se realizaron exámenes clínicos y microbiológicos al inicio y a los 10 meses de seguimiento.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades bucales son las enfermedades crónicas más comunes, siendo un importante problema de salud pública por su alta prevalencia, impacto en los individuos y en la sociedad, y el alto costo de su tratamiento (Sheiham A, 2005).

La caries dental es la patología bucal más prevalente tanto en Chile como en el mundo. Éstas se inician desde los primeros años de vida y presentan un importante incremento con la edad. La caries dental se considera dentro del grupo de enfermedades crónicas que son complejas o multifactoriales desde una perspectiva de causalidad, de manera similar a otras enfermedades como el cáncer, la diabetes o las enfermedades cardíacas (Fejerskov, 1994; Saunders R, Meyerowitz, 2005). La caries dental resulta de la interacción a través del tiempo de distintos factores, como las bacterias presentes en la placa bacteriana o biofilm, la dieta alta en hidratos de carbono que las bacterias metabolizan produciendo ácido, y diversos factores del huésped, como las características de los dientes y de la saliva. Todo esto influido por las condiciones de vida de las personas que se conocen como los determinantes sociales de la salud (Marsh, 2006).

MARCO TEÓRICO

Caries dental enfermedad crónica

Las enfermedades crónicas (EC) se definen como enfermedades de curso prolongado, que no se resuelven espontáneamente, rara vez se curan totalmente, pueden ser prevenibles al actuar sobre los factores de riesgo, pueden compartir varios factores de riesgo, y además presentan efectos interactivos, aditivos y sinérgicos. Si estos factores de riesgo fueran eliminados se podría prevenir al menos 80% de las enfermedades del corazón, el ataque cerebral, la diabetes tipo 2, y 40% de los cánceres (OMS, 2005).

La caries dental se considera dentro del grupo de enfermedades crónicas que son complejas o multifactoriales desde una perspectiva de causalidad, de manera similar a otras enfermedades como cáncer, diabetes o enfermedades cardíacas (Fejerskov O., 1994; Saunders R. et al., 2005). Esta enfermedad se manifiesta con lesiones de caries en los dientes, las que son reversibles antes que se produzca la cavitación.

La caries dental ocurre como un proceso dinámico y complejo en el que interactúan el biofilm bacteriano y la superficie del diente (Kidd, 2004).

Los signos de la enfermedad son las lesiones de caries, y son producto de la desmineralización progresiva y localizada de los tejidos duros del diente, debido a la baja del pH provocada por la metabolización de los azúcares fermentables presentes en el biofilm (Fejerskov y Kidd, 2003).

Muchos son los factores que influyen en la magnitud de las fluctuaciones de pH, los que también determinan la probabilidad de que se produzcan pérdidas de mineral y la tasa a la cual ésta se produce. Algunos de estos determinantes están referidos a hábitos dietéticos, a las concentraciones de fluoruros presentes en la cavidad oral, a aspectos relacionados con la saliva y a influencias ambientales altamente complejas que se pueden resumir en factores conductuales y socioeconómicos (Fejerskov, 2004). (Figura 1)

Esquema de factores determinantes de la caries dental

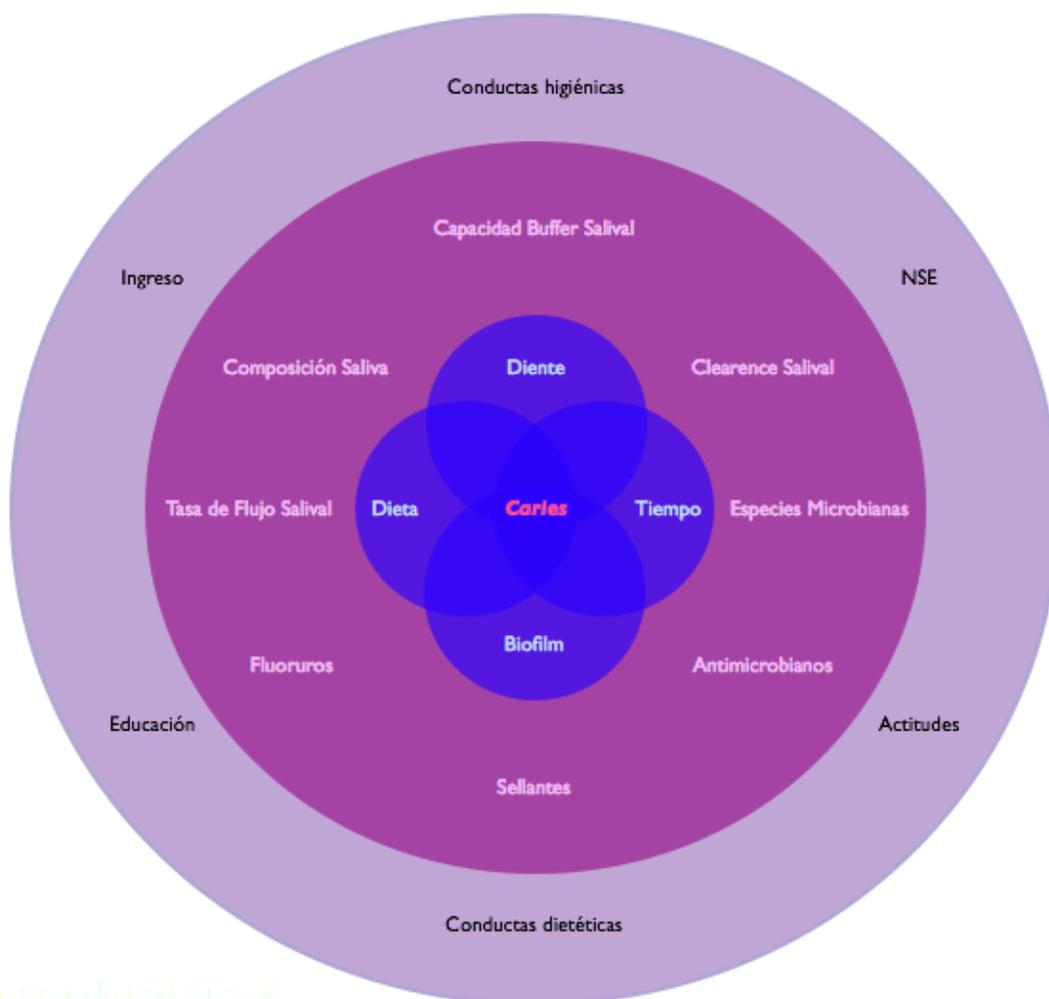


Figura 1: Interacción a través del tiempo de distintos factores, como las *bacterias* presentes en el biofilm, la dieta alta en hidratos de carbono y factores del huésped influido por las condiciones de vida como los determinantes sociales de la salud. (Fejerskov 1994, Saunders R & Meyerowitz C, 2005).

En la mayoría de los países en desarrollo, la caries dental no es tratada (Carino et. al., 2003, Yee y Sheiman, 2002). Afortunadamente, a diferencia de otras enfermedades crónicas, la caries dental tiene una muy baja mortalidad, lo que no causa alarma pública. Sin embargo, el costo social y económico que conlleva es significativo (Yee y Sheiman, 2002).

Existen factores de riesgo únicos de caries en los niños pequeños y son: la microbiota y sus sistemas de defensa se encuentran en plena maduración, las superficies dentarias nuevas suelen presentar defectos hipoplásicos y los padres se encuentran en la transición de la lactancia materna al uso del biberón y luego al consumo de los primeros sólidos, todos determinantes particulares de la condición etárea que presenta esta población (Seow, 1998).

Caries Temprana de la Infancia

La caries en el grupo de preescolares se presenta generalmente en una forma particular denominada caries temprana de la infancia (CTI), o como se denomina en algunas ocasiones: caries del lactante, caries del biberón o caries rampante (Davies 1998, Horowitz 1998, Amid y Woosung 1999, Cruzon y Preston 2004). La caries temprana es altamente prevalente en la población de nivel socioeconómico bajo y grupos cercanos a la pobreza; aquellos niños con experiencia de caries, independiente del nivel de ingresos de su familia, presentan un gran número de dientes afectados; y las lesiones de caries en este grupo de edad se encuentran generalmente sin tratamiento (Tinannoff et al., 2002). Mientras que los desequilibrios en el balance entre bacterias, sustrato y hospedero representan los factores etiológicos tradicionales de la caries, las condiciones familiares, económicas y sociales poseen un impacto sustancial en este grupo etáreo (Harrison, 2003).

Los niños con caries en la edad preescolar se encuentran en mayor riesgo de desarrollar caries en el futuro que aquellos libres de caries, determinando que la presencia de caries en la dentición temporal represente un indicador de riesgo para el desarrollo de lesiones en la dentición permanente (Peretz et al., 2003). El mejorar las estrategias de prevención y la intervención temprana de los factores de riesgo puede generar enormes beneficios a la salud de los preescolares (Tinanoff et al., 2002)

La CTI representa una forma particularmente agresiva de caries que afectan a los niños pequeños, y se relaciona fuertemente con la presencia de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*(Grupo *Mutans Streptococci*) (Caufield et al., 1993;. Berkowitz, 1996; Becker et al., 2002;. Beighton et al., 2004). Sin embargo, un gran número de estudios reportan que la mera presencia de *S. mutans* no es suficiente para predecir la formación de la caries dental en niños (Burt et al., 1985;. Loesche, 1986), ya que aunque la biología de la caries temprana de la infancia en general es similar a otros tipos de caries, puede verse modificada por múltiples factores exclusivos de la edad preescolar, relacionados con la implantación temprana de bacterias cariogénicas, inmadurez de los sistemas de defensa del hospedero y patrones de comportamiento asociados a prácticas de alimentación y de higiene que dependen de sus cuidadores (Seow, 1998).

Correlación entre *S. mutans* y CTI

Existe evidencia epidemiológica que ha establecido una correlación positiva entre el *S. mutans* y la CTI (Loesche, 1986; Matee et al., 1992; Li et al., 1994, 2000;. Berkowitz, 1996; Babaahmady et al., 1998;. Becker et al., 2002;. Beighton et al., 2004). Sin embargo, Ge y cols. han establecido que la presencia de *S. mutans* por sí sola no es el único indicador para el aumento del riesgo de caries ya que en sus resultados se encontró que en los niños con CTI severas ,medidos por el índice COPD/ceos, presentaban altos niveles en el recuento de *estreptococos totales*, sugiriendo que otras especies bacterianas orales también pueden contribuir a la diferencia en el desarrollo de caries ya que los *S. mutans* comprende menos de un 5% del total de estreptococos orales (Thurnheer et al., 2001)

Caries asociada a otras Bacterias orales

Estudios clínicos han demostrado que la caries se asocia con un aumento en *Streptococci Mutans* (tales como *S. mutans* y *S. sobrinus*) y *Lactobacillus* sp, que son capaces de desmineralizar el esmalte (Loesche, 1986; Becker, 2002). Estas bacterias pueden metabolizar rápidamente la dieta en ácido, creando un pH bajo localmente. En estas condiciones se vuelven más competitivos, mientras que la mayoría de las especies asociadas a la salud del esmalte son sensibles a las condiciones ambientales ácidas. Sin embargo, aunque las bacterias del grupo Mutans (*Mutans streptococci*) están fuertemente implicados con caries, la asociación no es única, ya que se pueden producir caries en ausencia de estas especies, como también el grupo Mutans puede persistir sin evidencia de detectable desmineralización (Marsh, 1989; Bowden et al., 1976).

La presencia de otras especies de estreptococos orales en la cavidad oral también puede modular el resultado de caries en los niños. Una de estas especies es *Streptococcus sanguinis* que predominan el biofilm autóctono, y por lo general se asocian con la superficie de los dientes libres de caries (Marchant et al, 2001;. Becker et al., 2002.). De hecho, varios investigadores, utilizando métodos de cultivo convencionales, han deducido a partir de sus estudios que *S. sanguinis*, puede desempeñar un papel antagónico contra la colonización de *S. mutans* (De Stoppelaar et al., 1969;. Loesche et al., 1984;. Caufield et al., 2000).

Biofilm microbiológico oral

El biofilm microbiológico oral, convencionalmente llamado placa bacteriana, es una comunidad microbiana con un alto grado de organización, durante la formación de la placa bacteriana, existen algunas bacterias orales que son los colonizadores primarios que expresan componentes bioquímicos que les permiten adherirse eficazmente a los tejidos específicos (superficie dentaria o tejido periodontal). Los colonizadores secundarios contienen componentes que les permiten adherirse a los colonizadores primarios, otorgándoles ventajas competitivas. Dentro de una placa bacteriana establecida, se encuentran bacterias específicas ubicadas una al lado de la otra y mezcladas entre ellas para formar una única estructura que puede conferir adherencia a las superficies dentarias. (Xuesong He et al., 2009).

Los potenciales patógenos pueden presentarse o ser transmitidos en un bajo número en el biofilm, lo que puede ser compatible con salud oral. Pero cuando existe una mayor presión ecológica, los patógenos compiten con la microflora residente y logran niveles de dominancia numérica necesaria para que ocurra enfermedad de caries. Algunas presiones ecológicas para que ocurra la enfermedad incluyen dieta rica en carbohidratos, condiciones de bajo pH y bajo flujo salival. (Figura. 2)

La enfermedad puede ser prevenida no solamente enfocada a los patógenos directamente (ejemplo: utilización de antimicrobianos o agentes anti adhesivos), sino también puede ser prevenida indirectamente interfiriendo en la presión ecológica responsable de la selección del patógeno. (Marsh, 2006)

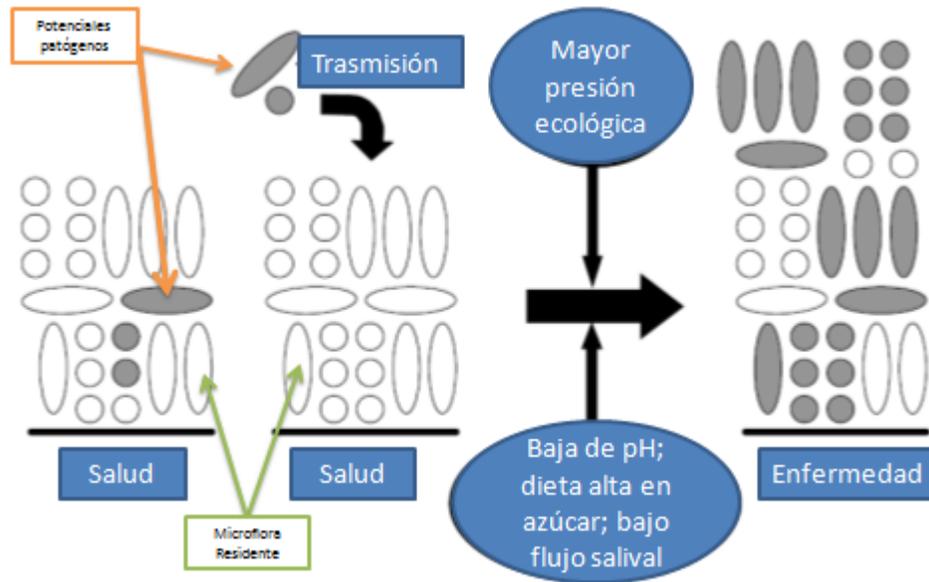


Figura.2. Relación entre la composición microbiana del biofilm oral en salud y enfermedad.

El tratamiento odontológico se ha centrado principalmente en la eliminación de la placa bacteriana o en la restauración de la lesión. Dado que la placa bacteriana está formada por un gran número de bacterias comensales junto con un número limitado de agentes patógenos orales, este enfoque puede no ser efectivo ya que el "extirpar toda la placa o matar a todos" crea superficies abiertas no competitivas para los agentes patógenos que intentan repoblar la cavidad oral (Xuesong He et al., 2009) . Con esta nueva comprensión de las interacciones microbianas en la cavidad oral, ha comenzado a existir un interés en los enfoques que inhiben selectivamente a los patógenos orales o modulan la composición microbiana de la placa, para el control de la patogénesis microbiana en la comunidad. En los últimos años, la microbiología oral se ha convertido en un área importante para desarrollar nuevas tecnologías que podrían ser útiles para la gestión de otras comunidades microbianas favorables para la salud bucal.

Entre ellos, el enfoque probiótico ha sido un método popular para la modulación de estas comunidades y de esta forma un nuevo acercamiento preventivo para el control de caries basado en el concepto de cambios de la ecología del biofilm oral. (Xuesong He et al., 2009)

Bacterioterapia

El interés en la bacterioterapia ha aumentado notablemente en los últimos años, utilizándose para prevenir y controlar condiciones orales y médicas, ya que el proyecto del microbioma humano ha aportado ideas tales como, que los biofilms dentro y fuera del cuerpo, han co-evolucionado con la humanidad, y desempeñan un importante papel en el mantenimiento de la salud. Esto también es cierto en la cavidad oral, en la que la microbiota no juega un papel pasivo sino que contribuye activamente a la mantención de la salud oral. En otras palabras, el equilibrio entre beneficio y las bacterias patógenas son esenciales para la estabilidad y el bienestar oral. Sin embargo, ciertos cambios ecológicos en la microbiota oral permiten que se manifiesten patógenos y causen enfermedades. En cuanto a la caries dental, un consumo frecuente de hidratos de carbono fermentables puede conducir a un entorno que favorece especies acidúricas (por ejemplo, *Streptococcus mutans* y *Lactobacilos*), la reducción de la diversidad de biopelículas y la desmineralización del esmalte. La bacterioterapia es el término utilizado cuando una cepa efectora inofensiva se implanta en la microflora del huésped para mantener o restaurar un microbioma natural e interferir e inhibir otros microorganismos, especialmente patógenos.

Esto podría conducir a formas alternativas de combatir enfermedades infecciosas con menos efectos secundarios perjudiciales, y también puede ayudar en el tratamiento de trastornos que parecen no tener nada que ver con bacterias, como el asma, la obesidad y la diabetes (Twetman, 2012).

Probióticos

Los probióticos se definen como microorganismos vivos los que al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios al hospedero (Guarner et., 2005). Hay múltiples tipos de probióticos, pero los ampliamente usados e investigados en medicina son *Lactobacillus* sp, *Bifidobacterium* sp y *Saccharomyces boulardii* (Sazawal et. al., 2006).

Mecanismo de acción de los probióticos

Se han propuesto diversos mecanismos de acción para los probióticos a nivel de la salud general, entre ellos destacan la competición directa con bacterias patógenas a nivel intestinal, la inmunomodulación y mejora de la inmunidad. En niños con atopía se ha visto que los probióticos podrían contribuir al desarrollo temprano de tolerancia inmune durante el primer año de vida, disminuirían la excesiva respuesta inmune a antígenos externos y ayudarían a regular el proceso inflamatorio balanceando la producción de citocinas pro y antiinflamatorias. En niños con alergias alimentarias se ha visto que los probióticos revierten la excesiva permeabilidad intestinal característica de esta condición, así como mejora la respuesta de la Inmunoglobulina A sérica que es defectuosa en estos casos (Sazawal et al., 2006).

La mayoría de los beneficios de los probióticos se relacionan con condiciones gastrointestinales, como diarrea secundaria a tratamiento antibiótico, diarrea aguda infecciosa y síndrome de intestino irritable. Además existe evidencia no concluyente en relación a tratamiento de síntomas en niños con dermatitis atópica, candidiasis vaginal, infección gástrica por *Helicobacter Pylori*, enfermedad inflamatoria intestinal e infecciones respiratorias altas (Sazawal et al., 2006).

Los probióticos en salud oral son un área de investigación relativamente nueva. Los *lactobacilli* son considerados bacterias cariogénicas, pero estudios *in vitro* y estudios clínicos apoyan la idea de efectos beneficiosos en la salud oral (Badet, 2008).

Los lactobacilos son bacterias altamente acidogénica y acidúricos, y crecen de manera óptima bajo condiciones ligeramente ácidas. Se les considera una parte normal de biofilm oral y comprenden aproximadamente el 1% de las especies que pueden cultivarse. Las bifidobacterias, por otra parte, se producen sólo en cantidades diminutas en la biopelícula oral normal. Es importante destacar, sin embargo, que no todas los lactobacilos (o bifidobacterias) son probiótico y poseen la capacidad de conferir beneficios para la salud del huésped. (Twetman, 2012)

Aunque la teoría de que ciertas bacterias pueden tener efectos beneficiosos sobre la salud se presenta a principios de 1900 por el premio Nobel Ilya Metchnikof, los mecanismos de acción todavía no se han logrado entender completamente. Sin embargo, se determinó que no son locales (directos), así como los eventos sistémicos (indirectos) que se producen por la regulación de la respuesta inmune. (Reid, 2011).

Los potenciales mecanismos de acción de los probióticos contra bacterias patógenas son:

1. Co-agregación y la inhibición del crecimiento,
2. Producción de bacteriocina y de peróxido de hidrógeno,
3. Exclusión competitiva a través actividad antagónica sobre la adhesión y la nutrición.
4. Inmunomodulación.

Por consiguiente, la composición y la actividad metabólica de la biopelícula oral pueden ser modificadas temporalmente. Los efectos de las bacterias probióticas parecen ser cepa específica, y no puede ser aplicada directamente a otras cepas. Por otra parte, las mismas cepas pueden tener un efecto diferente en cada individuo. (Köll-Klais, 2005).

Los probióticos son bacterias que no colonizan permanentemente el huésped. Sin embargo esta colonización permanente no es necesaria para que se produzca su acción. Los estudios realizados en las heces, la placa y la saliva muestran claramente que las bacterias probióticas ingeridas se recuperan sólo hasta una semana después de terminar el consumo de ellas. (Yli-Knuutila, 2006).

En la actualidad, la evidencia sugiere que los probióticos se pueden aplicar al control de la caries dental (Nase et al., 2001;.Comelli et al., 2002;.Meurman, 2005;Caglar et al., 2005^a; He et al., 2009; Tanzer et al., 2010). En particular, los géneros de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, pueden ejercer efectos beneficiosos en la cavidad oral mediante la inhibición de *Streptococcus* y *Candida* sp. (Meurman 2005). Los probióticos han sido probados en contra de miembros específicos de la microbiota, a menudo *Streptococcus mutans* (Beighton 2009) debido al papel central de estos microorganismos en la caries dental (Loesche, 1986, Tanzer et al., 2001; He et al., 2009).

Los probióticos se pueden utilizar como una medida de auto-aplicación por vía oral proporcionados por los diferentes vehículos en una de las cuatro formas básicas:(i) concentrados añadidos a las bebidas (por ejemplo el jugo de frutas), (ii) inoculadas en fibra prebiótica que promueven el crecimiento de bacterias probióticas, (iii) inoculadas en los alimentos lácteos o productos lácteos (por ejemplo, bebidas de leche, yogurt, queso) y (iv) como células liofilizadas, secos envasados como suplementos dietéticos (comprimidos, masticar goma,). El consumo diario de productos de yogurt y productos lácteos, parece ser la forma más natural de la ingestión de las bacterias probióticas, teniendo en cuenta los beneficios nutricionales de estos alimentos (Twetman y Steckslen-Blicks, 2008).

La administración de *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus rhamnosus* GG sugiere el descenso de los recuentos salivales de *mutans streptococci* (MS) (Caglar 2006, Näse 2001) y recientemente un estudio demostró *in vitro* la coagregación *lactobacillus/MS* especialmente de *Lactobacillus paracasei* y *L. rhamnosus* (Lang, 2010).

Otro estudio muestra que cuatro cepas de *Lactobacillus*, comúnmente utilizados como probióticos, incluyendo *L. rhamnosus*, interfieren con la formación de biofilm con *S. mutans in vitro* (Söderling, 2010). Más aún, un estudio clínico randomizado y controlado con 7 meses de seguimiento muestra una reducción de la incidencia de caries en un grupo de niños que consumieron leche con *L. rhamnosus* (Näse, 2001). (Tabla 1)

El más reciente estudio clínico se desarrolló en Suecia, con un seguimiento de 21 meses y el consumo regular de leche suplementada con *L. rhamnosus* LB21 y fluoruros, este estudio reportó una reducción en la incidencia de caries en niños preescolares, como también beneficios adicionales a la salud general, tales como menor número de días con tratamiento antibiótico (Stecksén-Blicks et al., 2009). (Tabla 1)

Tabla 1: Ensayos clínicos controlados con caries como punto final. El desarrollo de caries en comparación con la leche estándar sin suplementos

Primer Autor	Diseño del estudio	N; edad	Vehículo	Tiempo	Probiótico utilizado	% de abandono	Fracción de prevención	Caries test/control
Näse, 2001	ECR	594; 1-6	Leche	7 meses	<i>L.rhamnosus</i> GG	24%	21%	15% / 19%
		164; 3-4	Leche	7 meses	<i>L.rhamnosus</i> GG	-----	56%	10% / 23%
Stecksén-Blicks, 2009	ECRC	174; 1-5	Leche	21 meses	<i>L.rhamnosus</i> LB21+ 2.5 ppm F	25%	75%	Δ dmfs 0.4 / 1.6(Pc)

ECR = Ensayo Clínico Randomizado, ECRC = Ensayo Clínico Randomizado por Cluster, PC= Prevalencia de caries, dmfs(decayed missing filled surfaces) = superficie cariada perdida obturada.

Prevalencia de caries en Chile

En Chile, la caries temprana de la infancia también es un problema de salud pública. Datos no publicados del Ministerio de Salud de Chile muestran que los niños de 2 años de edad tienen una prevalencia de caries de alrededor de 17% y un índice ceod de 0,54 en la Región Metropolitana. (MINSAL, 2007). (Figura 3)

Prevalencia de caries en Chile

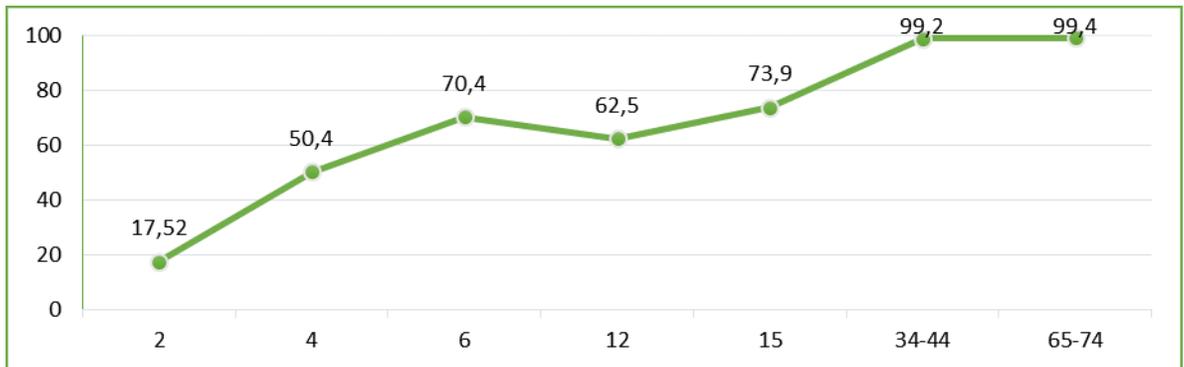


Figura 3. La prevalencia de la caries va desde 17,52% a los 2 años hasta casi el 100% en la población adulta.

El mismo estudio muestra una prevalencia de 48% para los niños de 4 años de edad con un índice ceod de 2,32. (MINSAL, 2007)

Daño por Caries en dentición temporal

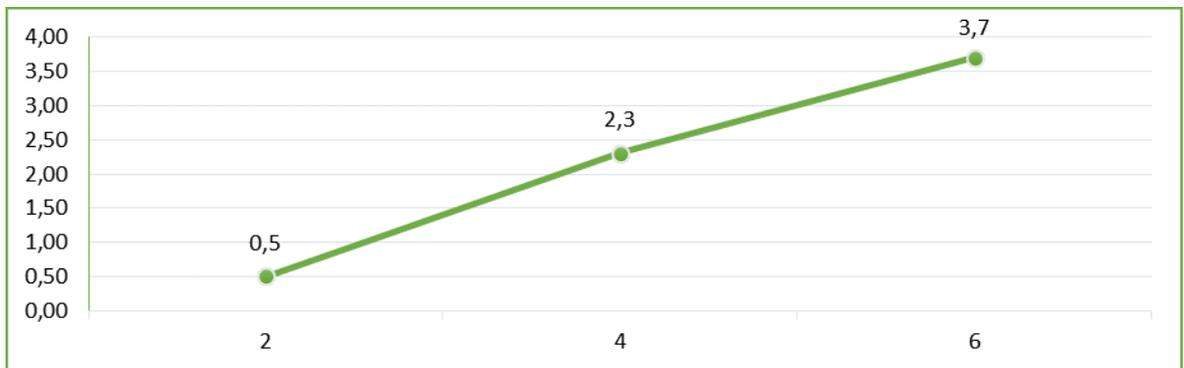


Figura 4. ceod; número de dientes temporales cariados, obturados y perdidos por caries a los 4 años de 2,3.

Los datos nacionales para la población de niños de 6 años de edad muestran una alta prevalencia de caries (Figura 5) y un índice ceod de 3,71 (MINSAL, 2007). (Figura 4)

Prevalencia de caries según edad. Chile 1992-2007

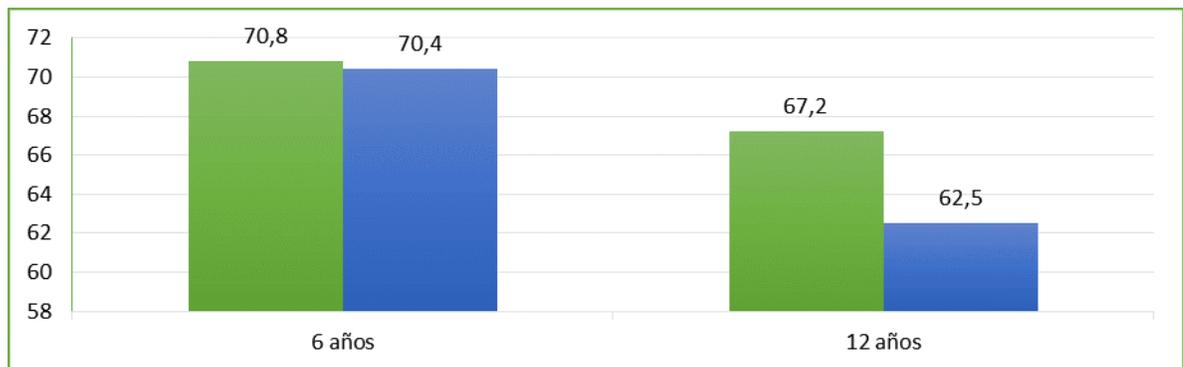


Figura 5: prevalencia de caries de un 70% en niños de 6 años y de más del 60% a los 12 años en 1992 y 2007.

Estos resultados muestran una alta prevalencia y severidad de caries en este grupo de niños, que hasta ahora se ha abordado desde un punto de vista restaurador, con el consiguiente costo económico y social, sin resolver el problema de la rápida aparición de lesiones de caries en este grupo etáreo.

Una carga de enfermedad (caries) de esta magnitud en los niños preescolares merece atención y nuevas aproximaciones terapéuticas. Por lo anterior este estudio en preescolares se propuso, como una alternativa real para disminuir la prevalencia de caries y la severidad de esta misma.

La pregunta de investigación es: Los preescolares que consumen regularmente leche enriquecida con probióticos en sus jardines infantiles ¿presentan una menor incidencia de caries y un menor recuento de bacterias *Mutans Streptococci*, en comparación con los preescolares que consumen regularmente bebidas lácteas sin probióticos durante 10 meses de seguimiento?

Dado que Chile tiene mayor prevalencia de caries en la población preescolar comparado con la población sueca, se espera encontrar diferencias más marcadas en términos de incidencia de caries con el uso de probióticos, que los reportados por los datos del estudio sueco (Stecksén-Blicks et al., 2009).

La interferencia bacteriana con bacterias probióticas apoya la estabilidad y diversidad de los biofilms orales y esto provoca un gran impulso en la odontología. Las investigaciones *in vitro*, así como en estudios clínicos con puntos finales bacterianos, sugieren que la interferencia del probiótico con la biopelícula oral, parece posible. Sólo unos pocos ensayos clínicos controlados y aleatorizados, informan sobre la caries en los resultados disponibles, pero la conexión a la salud general y las obvias fracciones preventivas de caries son un escenario prometedor. Sin embargo, resulta necesaria la realización de nuevos ensayos clínicos a gran escala y mayor tiempo de seguimiento, antes de adoptar la bacterioterapia en diversos vehículos, para prevenir y controlar la caries dental (Twetman, 2012).

En relación al estudio realizado los resultados favorables de éste entregan una alternativa de tratamiento no invasivo para el control de la caries dental, probablemente a un menor costo económico y social que el tratamiento restaurador, sin mediar profesionales odontólogos en su aplicación y con beneficios concomitantes relacionados con el consumo de leche, desde un punto de vista nutricional y relacionadas con la salud general con el consumo de probióticos.

HIPÓTESIS

Los preescolares que consumen regularmente leche enriquecida con probióticos en sus jardines infantiles presentan una menor incidencia de caries y un menor recuento de bacterias *Mutans Streptococci*, que los preescolares que consumen regularmente leche sin probióticos durante 10 meses de seguimiento.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del consumo diario de leche enriquecida con probióticos *Lactobacillus* y sin próbioticos, en la incidencia de lesiones de caries y en el recuento de carga bacteriana, en niños preescolares en 10 meses de seguimiento.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo Específico 1

Determinar la prevalencia e incidencia de caries, índice ceod y parámetros microbiológicos al inicio y a los 10 meses del estudio, en el grupo control (placebo).

Objetivo Específico 2

Determinar la prevalencia de caries e incidencia de caries, índice ceod y parámetros microbiológicos al inicio y a los 10 meses del estudio, en el grupo experimental (probiótico).

Objetivo Específico 3

Comparar los resultados clínicos y microbiológicos del grupo experimental con el grupo control al inicio y a los 10 meses de estudio.

METODOLOGÍA

Ensayo clínico controlado randomizado por clusters triple ciego. Los niños asignados al grupo experimental recibieron 100 mL de leche descremada con 10^7 UFC/gr *Lactobacillus rhamnosus* LRH08. La leche fue adquirida por el grupo investigador y despachada a los jardines infantiles regularmente.

La cepa probiótica utilizada fue proporcionada por la empresa Clerici Sacco, Italia. Su utilización (LHR08) se determinó ya que mediante una comparación previa de los fingerprints de DNA utilizando técnicas moleculares de caracterización, RAPD-PCR y Rep PCR, se demostró que *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus rhamnosus* LRH08, presentan el mismo patrón de amplificación, indicando que son la misma cepa (Istituto di Microbiología - Centro Ricerche Biotecnologiche - Università Cattolica del Sacro Cuore).

Las Educadoras fueron instruidas respecto al monitoreo del consumo de leche por los niños. Además se realizaron capacitaciones a las manipuladoras de cada jardín para que pudieran cumplir con la labor de preparar la leche según lo indicado por el fabricante. Un libro de registro fue mantenido en cada centro educacional para registrar la asistencia de los niños, o la ausencia debido a enfermedad y cuando el niño consumió o no la leche. Este libro se utilizó finalmente para valorar la adherencia a la intervención.

La leche experimental y la leche de control fueron consumidas solamente durante 5 días de la semana y no durante los fines de semana, feriados o periodos de vacaciones. Los niños del grupo control recibieron 100 ml de leche descremada sin el probiótico antes descrito. Ambos productos tenían las mismas características órgano lépticas para evitar sesgo de selección.

Población Objetivo y Muestra

La población objetivo fue la población de niños y niñas que asistían a educación preescolar en establecimientos dependientes de la fundación INTEGRAL. A estos jardines infantiles asisten principalmente niños que pertenecen a familias en situación de pobreza y/o vulnerabilidad social.

Una muestra de niños preescolares de 2 y 3 años de edad, que asistían a estos jardines infantiles de la fundación INTEGRAL en la Región Metropolitana en Chile fueron invitados a participar en este estudio.

Criterios de inclusión: Niños y niñas sanos desde un punto de vista de salud general con o sin lesiones de caries cavitadas al inicio del estudio y con el consentimiento informado firmado y aceptado por sus padre y/o apoderados.

Criterios de exclusión: Niños y niñas con alteraciones sistémicas de cuidado y/o que presenten intolerancia a la leche o alergia a alguno de los componentes de las leches experimentales y/o placebo, o que sus padres y/o apoderados no firmarán o aceptaran el consentimiento informado.

Este estudio clínico controlado fue randomizado por clusters, por lo que fue necesario ajustar el tamaño de muestra ante la variabilidad intraclusters. La decisión de randomizar de esta forma es de tipo operativa, ya que existe un gran riesgo de contaminar el estudio si las educadoras y/o manipuladoras de los alimentos en los jardines infantiles se confundían en la entrega de las leches experimentales o placebos a los niños de sus cursos. Al aleatorizar por curso, todo el curso consumió ya sea la leche experimental o placebo, minimizando la posibilidad de equivocación.

Los diferentes jardines fueron asignados de manera aleatoria a los grupos de intervención y control, mediante sorteo de números aleatorios. La condición de pertenencia al grupo control o intervención fue dada por un código de colores y un monitor independiente reveló el significado del código una vez que los datos fueron analizados.

Los examinadores clínicos, los investigadores, las familias, los niños y quienes analizaron los datos estuvieron ciegos al grupo de estudio al que fueron asignados.

Los niños solo fueron intervenidos una vez que sus padres y/o apoderados firmaron el consentimiento informado.

El tamaño muestral fue calculado considerando encontrar una diferencia de 1,1 unidad en el índice ceod, bajo un intervalo de confianza de 95% (DE: 2.85), un 20% de sobre muestreo ante posibles pérdidas de seguimiento y poder estadístico de 80%. Para la construcción de los clusters se consideró un coeficiente intra clase (ICC) de 0,01, tomando en cuenta que no existen antecedentes de ICC para incidencia de caries dental en esta población de estudio y la imposibilidad de realizar un estudio piloto debido al tiempo necesario y el costo asociado.

Un total de 20 clusters de 17 niños y/o niñas (10 clusters por grupo) fueron incluidos en el estudio, considerando que en promedio de alumnos de los curso de INTEGRRA es entre 15 y 20 preescolares. Finalmente obteniendo una muestra inicial de 340 niños.

Este tamaño de muestra fue calculado mediante un software llamado SAMPSIZE, desarrollado por Health Services Research Unit, University of Aberdeen, Scotland, UK (Campbell et al., 2004).

Técnicas de recolección de la información

Exámenes clínicos

Exámenes clínicos fueron realizados al inicio y a los 10 meses del estudio. Los exámenes fueron llevados a cabo por 2 equipos de odontólogos clínicos con experiencia, capacitados y calibrados en cada jardín infantil. Los exámenes se realizaron utilizando un espejo dental, una sonda OMS y luz artificial LED.

Las lesiones de caries fueron registradas siguiendo los criterios de la Organización Mundial de la Salud. El incremento de caries se definió como la diferencia entre los valores de caries dental del índice ceod al inicio de los periodos definidos de examen y los registrados a los 10 meses de seguimiento.

El índice ceod inicial definió la condición basal de los individuos para el cálculo de incidencia.

Test de confiabilidad inter e intra examinadores fue realizado antes de los exámenes de inicio, y a los 10 meses del estudio. Se alcanzaron valores clasificados como buen acuerdo (rango de índice Kappa 0,61-0,8).

Métodos microbiológicos

Al inicio y a los 10 meses, a cada niño del estudio se le tomó una muestra de saliva con una pipeta para análisis microbiológico.

Las muestras se transportaban en un recipiente a temperatura adecuada, de manera inmediata luego de ser tomadas, al laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. El proceso de siembra de estas muestras se realizaba de inmediato al ser recepcionadas.

Los frascos con la saliva obtenida se trasvasijaban a un tubo eppendorf, cada muestra era homogenizada mediante vibración mecánica, de la que se extraían 100 ul de saliva y se diluían en 900 ul de solución salina, de esto posteriormente se realizaban diluciones seriadas ; 1:10, 1:100, 1:1000,1:10000 y 1:100000, y luego se sembraban en Agar Rogosa para *Lactobacillus* sp, medio Agar Mitis Salivarius sacarosa Bacitracina (MSB agar) para *S. mutans*, (Gold et al., 1973), y medio diferencial para *S. sanguinis* (MM10) (Syed y Loesche, 1972).

Las placas sembradas fueron incubadas por 48 h a 37°C para *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* sp, y a 37° por 72 h para *S. sanguinis*.

Las colonias presentes en las placas fueron fenotípicamente identificadas, contadas y expresadas como UFC/mL de la saliva. Los datos obtenidos durante las dos fases del estudio se compararon para estimar los cambios en la composición del biofilm durante el periodo de estudio y comparar ambos grupos.

Registro de variables confundentes

Se registraron variables relacionadas con higiene oral y la dieta que se lleva a cabo en los jardines infantiles mediante entrevistas a las Educadoras de los jardines, para evaluar posibles interacciones o confusiones con la intervención en el desarrollo del end point.

Coordinación de trabajo de campo

Un coordinador de trabajo de campo dentro del equipo, mantenía el contacto permanente con los jardines infantiles, supervisando la entrega adecuada de las leches con y sin probióticos, además de fiscalizar el consumo de las leches por parte de los niños y la asistencia a clases de los preescolares, entre otras labores.

Plan de análisis de datos

Los índices de caries fueron calculados mediante la determinación de los promedios y correspondientes medidas de dispersión. Los promedios de ambos grupos se compararon a través del test t de student. De la misma manera, la incidencia de caries fue calculada como el incremento en el índice ceod en cada grupo de intervención y se compararon por el mismo test estadístico, ajustado por edad y género. Los resultados microbiológicos y la incidencia de caries, al ser proporciones, se compararon mediante un test de chi 2. Además se realizó análisis de interacción y confusión. El análisis de los datos se realizó con el programa estadísticos STATA.

RESULTADOS

Muestra obtenida

De un total de 520 niños preescolares matriculados en los jardines seleccionados, se pudieron incorporar al estudio solo 374 de ellos, los que contaban con el debido consentimiento informado por parte de sus apoderados y asistieron al examen inicial. Al tiempo basal (T0) se realizó el diagnóstico clínico al total de los niños autorizados. Sin embargo se obtuvo sólo de 223 de ellos la muestra de saliva adecuada para el análisis, ya que por tratarse de niños de no más de 3 años de edad, resultaba por momentos complicado obtener el volumen de saliva necesario. Al transcurso de los 10 meses (T1), se realizó un nuevo examen clínico, obteniendo una menor muestra, ya que 169 de los niños que habían participado del T0 se cambiaron de establecimiento, no asistieron al momento del examen o no pudieron ser ubicados por las educadoras para realizar el debido seguimiento. (Figura 5)

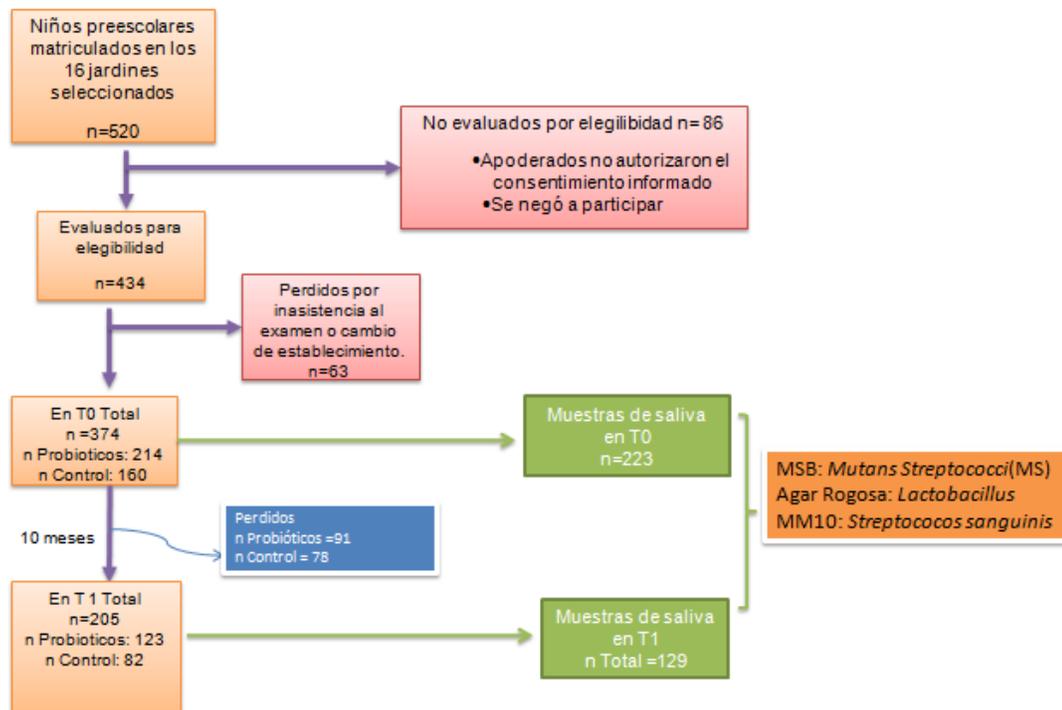


Figura 5. Esquema de Análisis de la muestra obtenida para los tiempos Basal (T0) y Final (T1).

Análisis de pérdida

Los niños preescolares que no formaron parte del T1 no presentaban diferencias significativas de género y tampoco de prevalencia de caries entre los grupos (control y experimental), siendo de porcentajes muy similares la proporciones de hombres contra mujeres que no se pudieron evaluar, como también porcentajes similares en la prevalencia y ausencia de caries de estos 169 niños. Por lo que no se puede determinar un abandono intencional del estudio ni una implicancia mayor en el análisis según estos ítems. Además haciendo un análisis comparativo con la muestra de individuos que completaron el seguimiento, los valores de cada parámetro tampoco resultaron con diferencias significativas entre sí, es decir, comparando tanto las proporciones en el género como la prevalencia de caries de los niños que abandonaron el estudio con la prevalencia de caries de los niños mantenidos en el seguimiento (Tabla 2).

Tabla 2: Proporciones de muestra perdida y mantenida en el tiempo

Parámetros	Perdidos n =169		Mantenidos en el seguimiento n = 205	
	Grupo Experimental	Grupo Control	Grupo Experimental	Grupo Control
Proporción de Mujeres	50,5% [40,1%-60,9%]	53,8% [42,6%-65%]	52% [43,1%-60,9%]	52,4% [41,4%-63,3%]
Proporción de Hombres	49,4% [39%-59,8%]	46,1% [34,8%-57,3]	47,9% [39%-56,8%]	47,5% [36,6%-58,5%]
Prevalencia de caries en T0	24,1% [15,2%-33%]	24,3% [14,7%-34%]	24,3% [16,7%-32%]	20,7% [11,8%-29,6%]

[] Intervalos de Confianza de un 95%.

Resultados Clínicos

Los resultados obtenidos del examen clínico en el tiempo inicial (T0) muestran que la proporción de mujeres y hombres es similar tanto en el grupo que consumió probióticos como en el grupo control. En los promedios de edad entre ambos grupos tampoco se apreciaron diferencias estadísticamente significativas tanto en el tiempo inicial (T0) como en el final (T1) (Tabla 3). En cuanto a la prevalencia de caries en el T0 fue mayor en el grupo experimental que en el control. Sin embargo en T1 la prevalencia de caries aumentó menos en el grupo que consumió periódicamente probióticos en comparación al grupo control. En el promedio de Índice ceod se observó que ambos grupos en T0 se encontraban con valores similares, no obstante se pudo apreciar una leve diferencia en el aumento de este índice en el T1 entre ambos grupos, aumentando 0,2 puntos menos en el grupo que consumió probióticos en comparación con el grupo control. (Tabla 3)

Los valores que arrojaron diferencias estadísticamente significativa en favor del grupo Probióticos, fueron las incidencia de nuevas lesiones caries y la incidencia de individuos con nuevas lesiones. Indicando que en el grupo control se encontró una nueva lesión (1,09) en promedio transcurrido los 10 meses de seguimiento comparado con el grupo de probióticos donde el promedio de nuevas lesiones fue de 0,7 no alcanzando al valor de número entero. Por lo que se estima que sería menos probable encontrar una nueva lesión de caries en el grupo probióticos que en el control, ya que en este último grupo si se encontró en promedio una nueva lesión de caries. En cuanto a la incidencia de individuos con nuevas lesiones de caries, se observó un resultado favorable también para el grupo probióticos, en este grupo en promedio el 14,6% de los individuos poseían nuevas lesiones en contra parte con el grupo control donde se encontró que el porcentaje de individuos con nuevas lesiones de caries fue mayor (24,3%) luego de los 10 meses de seguimiento (Tabla 3).

Tabla 3: Resultados Clínicos de los grupos experimental y control en relación a T0 y T1.

		Grupo Experimental	N =	Grupo Control	N =
Género	Proporción de mujeres	52% [43,1%-60,9%]	64	52,4% [41,4%-63,3%]	43
	Proporción de hombres	47,9% [39%-56,8%]	59	47,5% [36,6%-58,5%]	39
Promedio de Edad	T0	2,9 años [2,9-3]	214	2,9 años [2,8-3]	160
	T1	3,81 años [3,7-4]	123	3,69 años [3,6-3,8]	82
Media de prevalencia de caries	T0	24,3% [16,7%-32%]	214	20,7% [11,8%-29,6%]	160
	T1	39% [30,3%-47,7%]	123	45,1% [34,2%-56%]	82
Media de Índice ceod	T0	0,8 [0,6-1]	214	0,7 [0,4-1]	160
	T1	1,4 [1-1,8]	123	1,6 [1,1-2,2]	82
INLC		0,74 [0,5-0,9]*	123	1,09 [0,7-1,4]*	82
IINLC		14,6% [8,3%-20,9%]*	123	24,3% [14,9%-33,7%]*	82

INLC=Incidencia de Nuevas lesiones de caries. IINLC = Incidencia de Individuos con Nuevas Lesiones de Caries. [] Intervalos de confianza de un 95%.* Cifras con diferencia significativa entre ambos grupos de estudios con un p=0,0491.

Resultado Microbiológicos

Los resultados de los recuentos en los tres medios de cultivos realizados, específicos para cada grupo de bacterias que se determinaron como importantes de analizar por su participación en el proceso de caries, arrojaron que existe una tendencia a la disminución de la cantidad de bacterias (medidas por UFC/ml de saliva) pertenecientes al grupo Mutans (*Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*) en el grupo Experimental (Tabla 4). Es decir, al transcurso de los 10 meses de seguimiento se observó que existe una baja de recuentos de colonias de Mutans Streptococci en el grupo que consumió probióticos en comparación con el grupo control. Sin embargo, no se pudo apreciar una diferencia significativa de esta disminución, lo que puede ser atribuido al intervalo de tiempo de seguimiento. No obstante, la disminución en el recuento de estos patógenos indica una posible interacción o mecanismo de los probióticos para con los patógenos cariogénicos lo que ayudaría a disminuir su número y por lo tanto bajar un parámetro importante del riesgo de caries. En cuanto a los otros dos grupos de bacterias que se analizaron no hubo diferencias significativas entre los grupos ni dentro de ellos que pudiera manifestar alguna interacción de los probióticos con su presencia en el biofilm oral (Tabla 4). Cabe destacar que las colonias no fueron identificadas por pruebas bioquímicas o PCR, sino que, sólo se identificaron por características morfológicas y de adhesión al medio, para realizar su conteo.

Tabla 4: Recuento de colonias de bacterias al T0 y T1 medidas en UFC/ml.

Cultivo	Grupo	T0 (UFC/ml saliva)	T1 (UFC/ml saliva)
<i>Mutans Streptococci (MS)</i>	Grupo Experimental	3.06e+07 [1.86e+07 - 4.26e+07]	1.67e+07 [8815417 - 2.45e+07]
	Grupo Control	2.91e+07 [1.75e+07 - 4.08e+07]	2.72e+07 [1.04e+07 - 4.41e+07]
<i>S. sanguinis</i>	Grupo Experimental	3.24e+07 [2.41e+07 - 4.07e+07]	3.45e+07 [2.81e+07 - 4.10e+07]
	Grupo Control	3.42e+07 [2.49e+07 - 4.36e+07]	3.40e+07 [2.68e+07 - 4.11e+07]
<i>Lactobacillus</i> sp	Grupo Experimental	4.22e+07 [3.05e+07 - 5.38e+07]	2.71e+07 [1.94e+07 - 3.49e+07]
	Grupo Control	2.34e+07 [1.31e+07 - 3.38e+07]	1.95e+07 [1.15e+07 - 2.74e+07]

[] Intervalos de confianza de un 95%.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos luego de los 10 meses de seguimiento arrojan una clara ventaja del uso regular de probióticos en los niños preescolares, visible por la disminución estadísticamente significativa de la incidencia de nuevas lesiones de caries y la disminución de individuos con nuevas lesiones de caries en el grupo experimental. Ambos resultados clínicos dan cuenta de una posible interacción favorable en el proceso carioso del uso de estas leches enriquecidas con probióticos. En cuanto a los resultados microbiológicos es posible apreciar una tendencia a la baja de recuentos de colonias del grupo Mutans para el grupo que consumió probióticos, pero no se puede determinar la interacción ni el mecanismo que podría estar ocurriendo dentro de la placa bacteriana para explicar estos valores, así como tampoco se puede determinar que no existe mecanismo ni interacción con otros grupos de bacterias ya que los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el recuento de las otras colonias de bacterias en ambos grupos. Además el estudio es de un tiempo limitado lo que podría estar afectando a estos resultados microbiológicos poco concluyentes.

Cabe destacar que no hubo efectos secundarios detectados en el grupo experimental que se relacionen con el consumo regular de probióticos, esto se pudo determinar con el reporte por parte de los apoderados, los que no acusaron ningún tipo de inconveniente relacionado con la leche ingerida por sus pupilos.

Según la literatura los resultados clínicos obtenidos son similares a un estudio clínico randomizado y controlado con 7 meses de seguimiento donde, al igual que en este estudio, también se observó una reducción de la incidencia de caries en un grupo de niños que consumieron leche con *L. rhamnosus* (Näse 2001). Se debe mencionar que el promedio de recuentos de colonias de bacterias en la población de estudio de los jardines seleccionados, muestran una cantidad de colonias mayor que los estudios clínicos en otros países, indicando que existe una mayor carga bacteriana en esta población en comparación con la europea estudiada por Näse y colaboradores.

El medio MSB utilizado para el cultivo de *Mutans Streptococci* no permite una diferenciación adecuada entre las colonias del grupo Mutans por lo que el recuento incorporó a colonias de *S. mutans* y *S. sobrinus*, las que poseen características morfológicas similares al crecer en este medio. Además no se realizaron pruebas bioquímicas o PCR (convencional, en tiempo real, RAPD-PCR o AP-PCR) para identificar específicamente estas colonias, más bien se contaron todas las colonias del grupo *Mutans* por igual (Wan AK, 2002).

Por lo tanto, para resultados microbiológicos concluyentes se debe optar por otro medio de cultivo más específico de cada colonia y realizar identificación de estas por PCR para determinar con claridad el número de colonias presentes en las muestras, como también identificar el tipo de colonias que se encuentran en mayor y menor número.

Los resultados microbiológicos si bien en este estudio no hubo diferencias significativas en el recuento de *Mutans Streptococci* entre el grupo control y experimental, si se pudo apreciar una disminución en el recuento de estas colonias en el grupo que consumió probióticos al igual como se observó en otro estudio clínico donde se estima que la administración de *Lactobacilli reuteri* y *Lactobacilli rhamnosus* GG sugiere el descenso de los recuentos salivales de *Mutans Streptococci* (MS) (Caglar 2006, Näse 2001).

Para identificar el mecanismo de acción de los probióticos frente a las bacterias presentes en el biofilm se deben realizar estudios futuros que incorporen este análisis.

Por otra parte en cuanto a la pérdida de niños preescolares participantes del estudio en el tiempo Final (T1) se debió al cambio de colegio o establecimiento de algunos de los niños que participaron del T0, como también a la ausencia de estos al momento del examen, por lo que es importante destacar que no se debió al abandono intencional del seguimiento. Sin embargo el promedio de los valores no se vieron afectados por esta pérdida ya que tal como se observa en la Tabla 2, no hubo diferencias significativas entre los grupos de los niños perdidos y los mantenidos en T1.

Este estudio se realizó en el marco de un proyecto Fonis, por lo que su principal motor fue realizar una intervención que pudiera ser replicada en la realidad de la rutina diaria de los jardines infantiles, para que de esta forma, si se obtenían resultados favorables, pudiera ser incorporado en un futuro como una política de salud pública. Es por esto que, como los resultados fueron beneficiosos en cuanto a la incidencia de caries y a la disminución de recuentos bacterianos cariogénicos, la investigación cobra una gran validez externa, proponiendo esta medida como un bien extra a la salud de la población infantil sin efectos secundarios reportados, ya que los resultados se obtuvieron incorporando la gran cantidad de variables que podían afectar el seguimiento como la responsabilidad de las manipuladoras de la leche de incorporar el probiótico a la leche en polvo que consumían los niños a una temperatura determinada, como también la responsabilidad de las educadoras y técnicas que están a cargo de los niños para que consumieron la leche habitualmente, así como también se lidió con el gran número de preescolares que son cambiados de establecimiento educacional o la marcada inasistencia de los niños que se pudo apreciar en las visitas a los distintos exámenes realizados.

CONCLUSIONES

- El uso regular de leche enriquecida con probióticos disminuye significativamente la incidencia de nuevas lesiones de caries y la incidencia de individuos con nuevas lesiones de caries
- El uso regular de probióticos produce una tendencia a la disminución del recuento de colonias de *Mutans Streptococci* (*S.mutans* y *S.sobrinus*)
- No se reportaron efectos secundarios en el grupo experimental por el consumo regular de leche enriquecida con probióticos.
- El estudio presenta una gran validez externa ya que se realizó la intervención incorporando todas las variables involucradas en la rutina diaria de los niños preescolares en cada uno de los jardines, lo que establece un claro beneficio del consumo de esta leche enriquecida con probióticos, tanto para la salud general como para la salud oral de los niños.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alaki SM, Loesche WJ, da Fonesca MA, Feigal RJ, Welch K. (2002). Preventing the transfer of *Streptococcus mutans* from primary molars to permanent first molars using chlorhexidine. *Pediatr Dent*; 24:103–108
- Amid I., Woosung S. (1999) A Systematic Review of Clinical Diagnostic Criteria of Early Childhood Caries. *J Public Health Dent* 59(3):171-91.
- Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, Boches SK, Dewhirst FE, Griffen AL (2002). Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol*; 40:1001–1009
- Badenier O, Moya R, Cueto A et al. Prevalencia de las Enfermedades Bucodentales y necesidades de tratamiento en la V Región. Proyecto FONIS 2007
- Badet C, Thebaud N B. (2008) Ecology of lactobacilli in the oral cavity: A review of literature. *The Open Microbiology Journal* 2:38-48.
- Beighton D, Brailsford S, Samaranayake LP, Brown JP, Ping FX, Grant-Mills D, Harris R, Lo EC, Naidoo S, Ramos-Gomez F, Soo TC, Burnside G, Pine CM.(2004). A multi-country comparison of caries-associated microflora in demographically diverse children. *Community Dent Health*; 21:96–101
- Beighton D (2009). Can the ecology of the dental biofilm be beneficially altered? *AdvDent Res* 21(1):69-73.
- Bowden GH, Hardie JM, McKee AS, Marsh PD, Fillery ED, Slack GL: The microflora associated with developing carious lesions of the distal surfaces of the upper first premolars in 13–14 year old children. In *Proceedings Microbial Aspects of Dental Caries Volume 1*. Edited by: Stiles HM, Loesche WJ, O'Brien TC. Washington DC: Information Retrieval Inc.; 1976:233-241.
- Burt BA, Loesche WJ, Eklund SA. Stability of selected plaque species and their relationship to caries in a child population over 2 years. *Caries Res*. 1985; 19:193–200
- Caglar E, Kargul B, Tanboga I (2005). Bacteriotherapy and probiotics' role on oral health. *Oral Dis* 11(3):131-137.
- Caglar E, Kavaloglu S, Ergeneli S, Sandalli N, Twetman S. (2006) Salivary mutans

streptococci and lactobacilli levels alter ingestión of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by Strauss or tablets. *Acta Odontol Scand* 64:314-318.

Campbell M, Thomson S, Ramsay C, MacLennan G, Grimshaw J. (2004) Sample size calculator for cluster randomized trials. *Computers in Biology and Medicine* 34:113-1250

Carino KMG, Shinada K, Kawaguchi Y. (2003) Early childhood caries in northern Philippines. *Community Dental oral Epidemiology* 31:81-89

Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. (1993) Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res*; 72:37–45

Caufield PW, Dasanayake AP, Li Y, Pan Y, Hsu J, Hardin JM. (2000). Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infect Immun*; 68:4018–4023

Comelli EM, Guggenheim B, Stingle F, Neeser JR (2002). Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health. *Eur J Oral Sci* 110 (3):218-224.

Cruzon M.E., Preston A.J. (2004) Risk groups: Nursing Bottle Caries/Caries in the Elderly. *Caries Res* 38(Suppl 1):24-33.

Davies GN. (1998) Early Childhood caries- a synopsis. *Community Dent Oral Epidemiol* 26: Supplement 1:106-16.

De Stoppelaar JD, Van Houte J, Backer Dirks O. (1969) The relationship between extracellular polysaccharide-producing streptococci and smooth surface caries in 13-year-old children. *Caries Res.*; 3:190–199

Fejerskov O. (1994) An epidemiological approach to dental caries. En: Thylstrup A, Fejerskov O, editores. *Textbook of clinical cariology*. 2a ed. Copenhagen: Munksgaard.p. 159-91

Fejerskov O., Kidd A.M. (2003) *Dental Caries. The disease and its clinical management*. Blackwell Munksgaard Edition. Oxford. UK.

Fejerskov O. (2004) Changing paradigms in concepts on dental caries: Consequences for oral health care. *Caries Research* 38:182-191

- Ge, Y., Caufield, P. W., Fisch, G. S., & Li, Y. (2008). Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis Colonization Correlated with Caries Experience in Children. *Caries Research*, 42(6), 444-448
- Gold, O. G., Jordan, H. V., & Van Houte, J. (1973). A selective medium for Streptococcus mutans. *Arch Oral Biol* 18(11), 1357-1364
- Guarner F, Perdigon G, Coerthier G, Salminen S, Koletzko B, Morelli L.(2005). Should yoghurt cultures be considered probiotic? *Br J Nutr*; 93:783–786. [PubMed: 16022746]
- Harrison R. (2003) Oral Health Promotion for High-Risk Children: Case Studies from British Columbia. *J Can Dent Assoc* 69(5):292-6.
- He X, Lux R, Kuramitsu HK, Anderson MH, Shi W (2009). Achieving probiotic effects via modulating oral microbial ecology. *Adv Dent Res* 21(1):53-56.
- Horowitz H.S. (1998) Research issues in early childhood caries. *Community Dent Oral Epidemiol*26: Supplement 1: 67-81.
- Kidd E. (2004) How clean must a cavity be before restoration? *Caries Research* 38:305-313.
- Köll-Klais P, Mandar R, Leibur E, Marcotte H, Hammarström L, Mikelsaar M.(2005) Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiol Immunol*. Dec; 20(6):354-61.
- Lang C, Böttner M, Holz C, Veen M, Ryser M, Tanzer JM, et al. (2010) Specific lactobacilles/mutans streptococcus co-aggregation. *J Dent Res* 89:175-179.
- Loesche WJ (1986). Role of Streptococcus mutans in human dental decay. *Microbiol Rev* 50: 353–380.
- Marchant S, Brailsford SR, Twomey AC, Roberts GJ, Beighton D.(2001). The predominant microflora of nursing caries lesions. *Caries Res*. 2001; 35:397–406
- Marsh PD: Host defenses and microbial homeostasis: role of microbial interactions. *J Dent Res* 1989, 68:1567-1575.
- Meurman JH (2005). Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *Eur J Oral Sci* 113 (3):188-196.

MINSAL, Ceballos M, Acevedo C y col. (2007) Diagnóstico en Salud Bucal de niños de 2 y 4 años que asisten a la educación preescolar en la Región Metropolitana. Chile.

MINSAL, Soto L, Jara G y col. (2009). Diagnóstico en Salud Bucal de los niños de 2 y 4 años de edad que asisten a la educación preescolar en la zona norte y centro del país. Chile.

MINSAL, Soto L, Tapia R y col. (2007) Diagnóstico Nacional de Salud Bucal de los niños de 6 años. Chile.

Näse L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Pönkä A, Meurman J H, et al. (2001) Effect of long term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk children. *Caries Res* 35:412-420.

Peretz B, Ram D., Azo E. (2003) Preschool Caries as an Indicator of future caries: A longitudinal Study. *Pediatr Dent*. 25:114-118.

Reid G, Younes JA, Van der Mei HC, Gloor GB, Knight R, Busscher HJ. (2011) Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nat Rev Microbiol*. Jan; 9(1):27-38.

Saunders R, Meyerowitz C. (2005). Dental caries in older adults. *Dent Clin N A*; 49(2):293-308

Sazawal S, Hiremath G, Dhingra U, Malik P, Deb S, Black RE. (2006) Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo controlled trials. *Lancet Infect Dis*. 6(6):374-382.

Seow WK. (1998) Biological mechanism of early childhood caries. *Community Dent Oral Epidemiol* 26: Supplement 1:8-27.

Sheiham A. (2005). Oral health, general health and quality of life. *Bulletin of the World Health Organization* September, 83 (9)

Söderling E, Marttinen A, Haikioja A. (2010) Probiotic lactobacilli interfere with streptococcus mutans biofilm formation in vitro. *Curr Microbiol Sep* 11. [Epub ahead of print]

Soto L, Tapia R y col. Diagnóstico Nacional de Salud Bucal del Adolescente de 12 años y Evaluación del Grado de Cumplimiento de los Objetivos Sanitarios de Salud Bucal 2000- 2010. Chile 2007.

- Stecksén-Blicks C, Sjöström I, Twetman S. (2009) Effect of long-term consumption of milk supplemented with probiotic lactobacilli and fluoride on dental caries and general health in preschool children: A cluster-randomized study. *Caries Res*43:374-381.
- Syed, S. A., and W. J. Loesche. (1973). Efficiency of various growth media in recovering oral bacterial flora from human dental plaque. *J. Clin. Microbiol.* 26:459–465
- Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM (2001). The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ*65 (10):1028-1037.
- Tanzer JM, Thompson A, Lang C, Cooper B, Hareng L, Gamer A *et al.* (2010). Caries inhibition by and safety of *Lactobacillus paracasei* DSMZ16671. *J Dent Res*89 (9):921-926.
- Tinanoff N., Kanellis M., Vargas C. (2002) Current understanding of the epidemiology, mechanism, and prevention of dental caries in preschool children. *Pediatr Dent.* 24:543-551
- Twetman S, Stecksén-Blicks C (2008). Probiotics and oral health effects in children. *Int J Paediatr Dent* 18(1):3-10
- Twetman S, Keller MK. (2012). Probiotics for caries prevention and control. *Adv Dent Res.* Sep;24(2):98-102
- Xuesong He¹, Renate Lux¹, Howard K. Kuramitsu², Maxwell H. Anderson³, and Wenyuan Shi^{1, 3,*} (2009) Achieving Probiotic Effects via Modulating Oral Microbial Ecology. *Adv Dent Res.* 2009; 21(1): 53–56
- Yee R, Sheiman A. (2002) The burden of restorative dental treatment for children in third world countries. *International Dental Journal* 52:1-9.
- Yli-Knuutila H, Snäll J, Kari K, Meurman JH. (2006) Colonization of *Lactobacillus rhamnosus* GG in the oral cavity. *Oral Microbiol Immunol.* Apr; 21(2):129-31.
- Wan AK, Seow WK, Walsh LJ, Bird PS. (2002) Comparison of five selective media for the growth and enumeration of *Streptococcus mutans*. *Aust Dent J.* Mar; 47(1):21-6.

ANEXO