



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

**“Efecto del consumo de probiótico en la expresión de Beta Defensina
Humana 3 en niños preescolares. Seguimiento 3 meses”**

Rommel Andrés Johnson Vera

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Rodrigo Cabello

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dra. Begoña Ruiz

Prof. Dra. Francisca Sandoval

Adscrito a Proyecto FONIS SA11I2035

FONDECYT 1130570

Santiago-Chile

2014

INDICE

Contenido

1	RESUMEN	1
2	MARCO TEÓRICO	3
2.1	LA ENFERMEDAD DE CARIES	3
2.2	EPIDEMIOLOGÍA DE LA CARIES EN CHILE	4
2.3	COMPONENTE BACTERIANO DE LA ENFERMEDAD DE CARIES	4
2.4	MODELO DE CARIES Y SU ENFOQUE TERAPÉUTICO DE ENFERMEDAD DE CARIES.....	5
2.5	COMPONENTE SALIVAL COMO FACTOR PROTECTOR.....	6
2.6	PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS SALIVALES	6
2.7	DEFENSINAS SALIVALES	8
2.8	ALFA DEFENSINAS	9
2.9	BETA DEFENSINAS	10
2.10	ALFA Y BETA DEFENSINAS SALIVALES Y SU RELACIÓN CON CARIES	11
2.11	INMUNOMODULACIÓN Y BACTERIOTERAPIA	12
2.12	LOS PROBIOTICOS	13
2.13	MECANISMOS DE ACCIÓN PROBIÓTICA	14
2.14	VÍAS DE ADMINISTRACIÓN PROBIOTICA.....	14
2.15	PROBIÓTICOS Y CONTROL DE CARIES.....	15
3	HIPÓTESIS	17
4	OBJETIVO GENERAL	17
5	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
5.1	OBJETIVO ESPECÍFICO 1	17
5.2	OBJETIVO ESPECÍFICO 2	18
5.3	OBJETIVO ESPECÍFICO 3	18
6	METODOLOGÍA	18
6.1	POBLACIÓN OBJETIVO Y MUESTRA	19
6.1.1	<i>Aspecto ético</i>	19
6.1.2	<i>Criterios de inclusión</i>	20
6.1.3	<i>Criterios de exclusión</i>	20
6.1.4	<i>Construcción de grupos de investigación</i>	20
6.2	COORDINACIÓN DE TRABAJO DE CAMPO	21
6.3	TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN	21
6.3.1	<i>Exámenes clínicos</i>	21
6.3.2	<i>Toma de muestra</i>	22
6.3.3	<i>Análisis bioquímico</i>	22
6.3.4	<i>Plan de análisis de datos</i>	23
7	RESULTADOS	23
8	DISCUSIÓN	27
9	CONCLUSIONES	31
10	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
11	ANEXO	41

1 Resumen

Introducción: La caries dental es una enfermedad de alta prevalencia en niños en Chile. Resultante de un proceso dinámico, continuo y complejo, involucra colonización bacteriana sobre las estructuras dentarias, influyendo factores del hospedero y del medio bucal tales como hábitos dietéticos, aspectos relacionados con la saliva como concentraciones de fluoruros presentes en la cavidad oral, influencias ambientales y sociales.

La importancia de la saliva en la prevención de caries es bastante reconocida. El rol potencial los péptidos antimicrobianos como la beta-defensina humana 3 (HBD-3), contenida en ella han sido objeto de múltiples investigaciones por su estructura y funciones que ofrecen posibles aplicaciones farmacéuticas dada su demostrada actividad antibacteriana en contra de patógenos orales, incluyendo a *S. mutans*.

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.

Entre ellos los probióticos, microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios al hospedero, ha sido un método popular para la modulación de estas comunidades y de esta forma ofrece un nuevo acercamiento preventivo para el control de caries basado en el concepto de cambios de la ecología del biofilm oral.

Objetivo: Establecer el efecto del consumo de leche con y sin lactobacilos en la concentración salival de Defensina Humana 3 a tres meses plazo.

Materiales y Método: Se realizó un ensayo clínico controlado randomizado por clusters triple ciego en 36 niños y niñas preescolares de la fundación

INTEGRA de entre 2 y 3 años durante 3 meses. Todos ellos 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.

Se asignó un grupo control y otro experimental que recibió 100 mL de leche descremada con 10^7 UFC/gr *Lactobacillus rhamnosus* LRH08.

Se realizaron al inicio y a los 3 meses plazo exámenes clínicos de detección de lesiones de caries y toma de muestras de saliva para detectar HBD-3 par test de ELISA

Los índices de caries fueron calculados mediante la determinación de los promedios y correspondientes medidas de dispersión. Estos se compararon a través del test t de student. 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. El análisis de los datos se realizó con el programa estadísticos STATA.

Resultados: Se incorporaron al estudio 36 niños matriculados en los jardines seleccionados pertenecientes a la fundación INTEGRA, cuyos apoderadas asintieron con el consentimiento informado y cumplían con los criterios de inclusión. El 64% de la muestra era femenina y 36% masculina, con un promedio de 3 años de edad. Luego del primer examen clínico (T0), se ajustaron los grupos de estudio en 44% libre de caries y 56% con presencia de lesiones de caries.

Los datos se ajustaron a la presencia o no de lesiones de caries entre los grupos experimental consumidor de probióticos y el control. Estos muestran diferencias en la concentración salival de beta defensina humana 3 entre T0 y T1. Los individuos libres de caries del grupo experimental mostraron un aumento considerable en los valores de la misma, superior a cualquier otro subgrupo de la muestra

En tanto a los individuos con presencia de caries tanto en el grupo experimental como el control, disminuyeron su concentración salival de HBD-3 en casi la mitad de su valor para el grupo experimental y a un tercio para el control entre T1 y la medición basal T0.

Al realizar un test para análisis de muestras no paramétricas (Test de Mann-Whitney), entre los grupos experimental y control ajustado por presencia de caries sus resultados si bien evidencian diferencias en la concentración de HBD-3 en saliva, no son estadísticamente significativas ($p < 0,01$).

Conclusión: No existen diferencias estadísticamente significativas en la expresión de beta defensina humana 3 en preescolares que consumen regularmente leche enriquecida con probióticos en sus jardines infantiles después de tres meses de seguimiento.

2 Marco teórico

2.1 La enfermedad de Caries

La caries dental es una enfermedad de alta prevalencia a nivel mundial. Resultado de un proceso dinámico, continuo y complejo, involucra colonización bacteriana sobre las estructuras dentarias, influyendo factores del hospedero y del medio bucal tales como hábitos dietéticos, aspectos relacionados con la saliva como concentraciones de fluoruros presentes en la cavidad oral, influencias ambientales y sociales altamente complejas que se pueden resumir en factores conductuales y socioeconómicos (Hicks y Cols, 2003; Fejerskov, 2004)

El principal signo de la enfermedad son las lesiones de caries, producidas por 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).

2.2 Epidemiología de la caries en Chile

En Chile, la caries temprana de la infancia es un problema de salud pública. El Ministerio de Salud de Chile evidencia que en la región Metropolitana los niños de 2 años de edad tienen una prevalencia de caries de alrededor de 17% y un índice ceod de 0,54, 48% para los niños de 4 años de edad con un índice ceod de 2,32 (MINSAL, 2007).

A nivel nacional, la prevalencia de caries en niños de 6 años alcanza un 70% y de más del 60% a los 12 años en 1992 y 2007 (MINSAL, 2007), leve descenso en los indicadores explicado por el reemplazo de piezas deciduas afectadas durante la dentición mixta de segunda fase.

2.3 Componente bacteriano de la enfermedad de caries

El biofilm está conformado por células bacterianas adheridas y cohesionadas sobre un sustrato celular o inerte, involucrando un proceso de transformaciones físicas, químicas y biológicas bacterianas, influyendo sobre la expresión genética y variabilidad fenotípica de la comunidad bacteriana involucrada. (Hojo. K Y Cols, 2009).

La patogenicidad del biofilm sobre la bacteria oportunista en estado plantónico radica en dos principios:

- Capacidad de amplificar su resistencia antimicrobiana.
- Protección contra los mecanismos de defensa del propio hospedero.

La placa bacteriana dental es un típico ejemplo de biofilm, y explica la etiología de la cariogénesis (Lazar V, 2010).

Las bacterias cariogénicas tales como *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* son las responsables de la desmineralización del diente debido a su habilidad de producir ácido. Adicionalmente, son capaces de sobrevivir en este ambiente a pH bajo (Bowen y Koo, 2011). Microorganismos del grupo *S. mutans* han sido identificados como el principal patógeno involucrado en el desarrollo de las caries, sin embargo, en los últimos años se ha descrito que la microflora en la superficie del dental cambia con el desarrollo de la lesión de caries desde una predominancia de streptococci no mutans y *Actinomyces spp*, a una dominancia de *S. mutans* y otras bacterias no mutans, incluyendo lactobacilli y *Bifidobacterium spp*. (Takayashi y Nyvad, 2011).

2.4 Modelo de caries y su enfoque terapéutico de enfermedad de caries

Numerosas investigaciones buscan identificar factores de riesgo de la caries dental así como también identificar los componentes inmunes que pueden proteger contra la caries o evitar su desarrollo. Esto, porque el modelo de tratamiento quirúrgico de la caries, que involucra la remoción del tejido desmineralizado e infectado, no elimina el factor bacteriano dentro del modelo actual de caries. Por ello, los desafíos terapéuticos actuales apuntan a desarrollar esa línea, dada la demostrada incapacidad de los antibióticos y antimicrobianos en suprimir la infección totalmente. La posibilidad de repoblación de la cavidad oral con patógenos levanta serias dudas sobre la eficacia de las terapias clásicas en la eliminación del causal bacteriano, así como tampoco garantiza ninguna selectividad dentro de sus efectos, dejando la ventana abierta a que los patógenos restantes puedan repoblar las superficies del diente (Mauli y Cols, 2012).

2.5 Componente Salival como factor protector

El sistema de defensa salival juega un importante rol en la mantención de la salud de en la cavidad oral y en la prevención de caries (Van Niuw y Cols, 2004). Los atributos protectores de la saliva, tales como su capacidad buffer y el flujo mecánico, así como también los componentes del sistema inmune innato, funcionan colectivamente para mantener el balance entre salud y enfermedad. La importancia de la saliva en la prevención de caries es bastante reconocida. El rol potencial de las proteínas salivales y dentro de éstas, los péptidos antimicrobianos, han sido objeto de múltiples investigaciones (Phattarataratip y Cols, 2011).

2.6 Péptidos antimicrobianos salivales

Los péptidos antimicrobianos son antibióticos naturales que entregan una primera línea de defensa en contra de un amplio espectro de patógenos, que incluyen bacterias Gram + y Gram-, virus y hongos (Zasloff, 2002 ;Ganz, 2003).

Estos péptidos son un importante componente de la respuesta inmune innata, la cual contiene los mecanismos protectores que forman la primera línea de defensa capaz de reaccionar rápidamente y eliminar los potenciales patógenos (Underwood y Bevins, 2010).

Particularmente, su importancia en la cavidad oral se fundamenta en su efecto sobre la microflora bacteriana presente en un alto número todo el tiempo, protegiendo estructuras dentarias y mucosas. Muchas son las razones que responden a esto:

- Amplio espectro antimicrobiano.
- Sinergismo y co-expresión con otros antimicrobianos en saliva.
- Estimulación del sistema inmune adquirido, mejorando las funciones y producción de IgA e IgG.

Luego, los antimicrobianos orales proveen una verdadera barrera antibiótica natural, previniendo la formación de biofilm (Dale and Cols, 2006).

Existen 3 principales familias de péptidos antimicrobianos, definidas por la composición aminoacídica y por su estructura tridimensional (Abiko y Kaky, 2003):

1. Catelicidinas o LL-37. Son péptidos alfa helicoidal sin cisteína (Bals y Wilson, 2003). Sólo una catelicidina ha sido identificada en humanos, la cual es un péptido antimicrobial de 18kDa. Este péptido es expresado por neutrófilos y tejido epitelial, especialmente en la cavidad bucal y en el tracto respiratorio. Su función es quimiotaxis y estimulación de monocitos, células T, neutrófilos y mastocitos (Gordon, 2005).

2. Histatinas. Moléculas peptídicas con una inusual proporción de amino ácidos específicos (De Smet y Contreras 2005; Ganz, 2003). Las histatinas comprenden una familia de proteínas catiónicas de bajo peso molecular producidas y secretadas por la glándula parótida, submandibular y sublingual. Las histatinas generalmente exhiben actividad apoptótica en distintas cepas microbianas y una potente actividad antifúngica, especialmente contra *Candida Albicans* (Edgerton y Cols, 2000).

3. Defensinas. Péptidos con tres puentes disulfuro (Joly y Cols, 2004; Bartie y Cols, 2008). Las defensinas juegan un importante rol en la inmunidad humana debido a su variada expresión y su presencia tanto en tejidos sanos, como infectados o inflamados (Ganz, 2003). Estas moléculas se presentan dentro del rango micromolar y son ampliamente expresadas por epitelios así como por neutrófilos (Ganz, 2004).

2.7 Defensinas salivales

El principal mecanismo por el cual las defensinas ejercen su acción antibacteriana es por la permeabilización de la membrana, la cual en bacterias provoca la inhibición de la síntesis de RNA, DNA y proteínas (Ganz, 2003). La interacción de las defensinas con sus células blanco está dada por la atracción electrostática que se establece entre éstas. Su carga positiva interacciona con la membrana celular bacteriana dada la fuerte carga negativa que le entregan sus componentes, tales como el LPS en bacterias Gram negativas, polisacáridos en bacterias Gram positivas y los fosfolípidos propios de la membrana en el caso de ambas (Gomes y Fernandes, 2010).

En general las defensinas son expresadas en respuesta a la presencia de microorganismos y son responsables de la migración de células del sistema inmune innato (Diamond y Cols, 2009), activan la vía clásica del complemento y tienen el potencial de modular la respuesta inflamatoria a través de la regulación de la expresión de citoquinas y de moléculas de adhesión. Estos péptidos pueden funcionar como nexo entre la inmunidad innata y adquirida ya que provocan la quimiotaxis de linfocitos T, células dendríticas inmaduras y potencia la producción de anticuerpos (Tani y Cols, 2000). Evidencia de aquello es que miembros de la familia de las defensinas exhiben estructuras similares a las citoquinas liberadas por interacción con patógenos, generando actividad quimiotáctica. Específicamente las B defensinas poseen un potente efecto en este sentido, reclutando células T de memoria, células dendríticas inmaduras, neutrófilos, mastocitos y monocitos dependiendo del tipo de defensina, diferenciándose su efecto en base a la estructura de disulfuros que posea (Diamond G y Ryan LK, 2001).

Las defensinas pueden ser divididas en α y β defensinas, y el interés que ha generado su estudio está basado en su potente actividad antibacteriana, que tiene ventajas en relación a los antibióticos comunes, siendo capaces de actuar en contra de algunos patógenos que han desarrollado resistencia antibiótica (Hancock, 2001).

2.8 Alfa defensinas

Las α -defensinas son péptidos de 29 a 35 aminoácidos y son más cortos que las β -defensinas las cuales constan de 38 a 42 residuos (Raj y Dentino, 2002), ricos en aminoácidos catiónicos, lo cual les entrega una carga neta positiva (Ganz, 2003). Ambas familias contienen 6 residuos conservados de cisteínas, unidos mediante enlaces disulfuro. La estructura terciaria de estos péptidos consiste en 3 hojas beta antiparalelas, las cuales se encuentran constreñidas por los residuos de cisteína (Ganz, 2003). Las diferencias entre las familias se basa en el largo y el plegamiento de la cadena peptídica, la localización y la posición de los residuos de cisteína en la secuencia aminoacídica y en los puentes disulfuro, los cuales son responsables del emparejamiento de cisteínas (Gomes y Fernandes, 2010).

Las α -defensinas son expresadas por neutrófilos humanos y células Paneth (células especializadas de la mucosa intestinal). Los neutrófilos producen α -defensinas 1 a 4 (HPN-1 a HPN-4), mientras que la 5 y 6 (HD-5 y HD-6) son producidas por las células intestinales (Wu y Cols, 2004), y en el tracto genitourinario (Svinarich y Cols, 1997). En saliva total han sido identificadas las α -defensinas HPN-1, 2 y 3 (Goebel y Cols, 2000), donde tienen como función la muerte no oxidativa de microorganismos. Han sido identificadas en el fluido crevicular donde son producidas por los neutrófilos que migran desde el torrente sanguíneo a la cavidad bucal (Abiko y Kaky, 2003). Este flujo de neutrófilos es necesario para la salud periodontal y defectos en la función y quimiotaxis de éstos están asociados a enfermedad periodontal en niños (Pütsep y Cols, 2002).

Por otro lado, las beta defensinas HBD1-3, son producidas por las células epiteliales y han sido detectadas en glándulas salivales, encía, lengua y mucosa bucal (Harder y Cols, 2001). HBD1 es expresada constitutivamente (Sahasrabudhe y Cols, 2000), aunque también puede ser inducida, mientras las HBD2 y 3 son generalmente expresadas en bajos niveles, in vivo, bajo condiciones normales y tienen expresión inducible ya sea por estimulación por

componentes bacterianos o por mediadores inflamatorios (Harder y Cols, 2001; Dhople y Cols, 2006). Estudios in vitro usando líneas celulares y cultivos primarios confirman esta inducción y han identificado numerosas vías de señales de transducción responsables de ésta. En general, se ha observado que la HBD2 y 3 son inducidas in vitro en células epiteliales de mucosa y encía en respuesta a la mayoría de los patógenos orales (Diamond y Cols 2008).

2.9 Beta defensinas

La expresión de las beta defensinas puede ser por estimulación directa por los patógenos orales y también pueden ser inducidas por citoquinas pro-inflamatorias que incluyen IL1 β , TNF α y IL-17, que son producidas en respuesta a la invasión bacteriana, por lo tanto, ellas funcionan como agente antibiótico directo para mantener la homeostasis bacteriana de la cavidad bucal, y pueden naturalmente prevenir la colonización de patógenos (Diamond y Cols 2008; Diamond y Cols, 2009).

Entre las beta-defensinas humanas identificadas, la HBD-3 es de especial interés por estructura, funciones y también para posibles aplicaciones farmacéuticas. Su habilidad de exhibir actividad antibacteriana a concentraciones fisiológicas de sal en contra de Gram+ y Gram- (Wu y Cols, 2003), que está determinado por que presenta la mayor carga positiva en relación a las beta defensinas 1 y 2 (Schibli y Cols, 2002). Adicionalmente interviene en la inmunidad innata y en la inmunidad adaptativa, ya que participa en funciones biológicas como la quimio atracción, conectado ambas respuestas inmunes (Wu y Cols, 2003), las cuales son ventajas biológicas con respecto a otras beta defensinas.

Por otro lado, el análisis de la expresión del gen de HBD-3 en distintos órganos por RT-PCR, muestra fuerte expresión de su mRNA en piel, tráquea, lengua y amígdalas, pero menos frecuencia de expresión en glándulas salivales.

2.10 Alfa y beta defensinas salivales y su relación con caries

Se ha tratado de relacionar los niveles de alfa defensinas con el riesgo de caries. En un estudio realizado en 149 niños de 11 a 15 años, se midieron niveles de HPN1-3 en saliva no estimulada, donde niveles significativamente altos de estos péptidos fueron encontrados en pacientes con caries, por lo tanto, bajos niveles de HPN1-3 podrían representar un factor biológico que contribuye a la susceptibilidad de caries, pero este resultado no es del todo concluyente por las limitaciones metodológicas del estudio presentadas por el autor (Tao y Cols, 2005). Es por esto que se hace fundamental conocer cuál es la relación de estos péptidos con las enfermedades orales, ya que pueden complementar el diagnóstico de riesgo caries y adicionalmente ser utilizados como agente terapéuticos, tanto las α como las β defensinas.

En cuanto a las beta defensinas salivales, estudios in vitro utilizando HBD-3 recombinante, han demostrado que este péptido posee actividad antibacteriana en contra de patógenos orales, incluyendo a *S. mutans*, donde la mayor acción bactericida la ejerce en contra de anaerobios, siendo menor en aerobios (Song y Cols, 2009), a diferencia de otros estudios donde la HBD-3 tiene efecto bactericida en contra del 100% aerobios y de la mitad de los anaerobios (Joly y Cols, 2004). En otros estudios in vitro *S. mutans* tiene un alta susceptibilidad a H β D-3 (Ouhara y Cols, 2005).

El biofilm oral al ser expuesto in vitro a la acción de HBD-3, resulta en un aumento del número de bacterias muertas, mayor que cuando se tratan con clorhexidina o hidróxido de calcio (Lee y Cols, 2013). Zhu et al encontraron que

HBD-3 no sólo inhibe la formación y maduración del biofilm, sino que también reduce el biofilm preexistente en las superficies de implantes de titanio, inhibiendo la síntesis de polisacárido al nivel de transcripción de genes (Zhu y Cols, 2013).

En vista de los estudios realizados es necesario conocer en mayor profundidad cuál es la real relación de HBD3 con el biofilm oral y si existe relación como predictor del riesgo de caries. El interés en el análisis de estas interacciones ha aumentado notablemente en los últimos años, con la finalidad de ser utilizado para prevenir y controlar condiciones orales y médicas, dado 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.

2.11 Inmunomodulación y Bacterioterapia

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 (Twetman, 2012).

Envista y considerando a la caries como una enfermedad que dentro de su totalidad posee un componente infeccioso, cobra sentido apelar a terapias preventivas inmunológicas para su control, idea que aún no está comprobada del todo. Bajo dicha lógica, se recurren a métodos de inmunización activa y/o pasiva para lograr dicho efecto. Activa, en cuanto trata de inducir anticuerpos

anti *S. Mutans* antes de la erupción dentaria, y pasiva, cuando se administra por medio de alimentos de preferencia infantiles probiótico. Esta última es de la cual se tiene más evidencia respecto a sus avances (Pereira A y Cols, 2010).

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 y Cols, 2009).

2.12 Los Probioticos

Los probióticos se definen como microorganismos vivos los que al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios al hospedero (Guarner y Cols, 2005). Hay múltiples tipos de probióticos, pero los ampliamente usados e investigados en medicina son *Lactobacillu spp*, *Bifidobacterium spp* y *Saccharomyces boulardii* (Sazawal et. al., 2006). Una formulación aproximada de 10^8 bacterias probióticas por gramo o mililitro con una ingesta de 1.5-2 dl. Por día es recomendada, y los productos de consumo diario deben ser sin azúcar y endulzados sólo con endulzantes naturales (Petti y Cols, 2008).

Nuestro cuerpo contiene múltiples nichos ecológicos microbiológicos. Las bacterias pueden ser eliminadas de la cavidad oral por una serie de circunstancia que origina un desbalance en la misma. Esto puede producirse por el consumo de antibióticos, drogas, alcohol, estrés o exposición a sustancias toxicas, etc. En casos como estos, la perdida de ciertos grupos bacterianos deja la compuerta abierta a que competidores dañinos dañen nuestra salud oral. Los probiótico beneficiarían el establecimiento temporal de colonias beneficiosas, símil a las características y funciones de la flora natural, dando tiempo a la repoblación de esta última de la cavidad oral. Por esto los probióticos son llamados “correctores de ecosistema” (Mauli y Cols, 2012).

2.13 Mecanismos de acción probiótica

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.

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 aplicadas directamente a otras cepas. Por otra parte, las mismas cepas pueden tener un efecto diferente en cada individuo (Köll-Klais, 2005).

2.14 Vías de administración probiótica

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) como una cultura se concentran añadido 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, yogur, queso) y (iv) como células liofilizadas, secos envasados como suplementos dietéticos (comprimidos, goma de mascar). El consumo diario de 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 Stecksén-Blicks, 2008).

Evaluar cuan adecuado puede ser el vehículo de administración de un probiótico es esencial. Muchas de las formas en que naturalmente encontramos los probióticos son por medio de productos fermentados derivados de la leche (Garima Y Cols, 2012).

2.15 Probióticos y control de caries

En la actualidad, la evidencia sugiere que los probióticos se pueden aplicar al control de la caries dental (Nase y Cols, 2001;.Comelli y Cols, 2002;.Meurman, 2005;Caglar y Cols, 2005; He y Cols, 2009; Tanzer y Cols, 2010). Muchos estudios clínicos reportan efectos de reducción del desarrollo de caries con el uso de probióticos. Los probióticos comúnmente usados son acidogénicos y tienen la capacidad de disolver estructuras dentarias como el esmalte y dentina. Sin embargo, se ha visto que pocas cepas de lactobacilos participan en la caries, y las que lo hacen intervienen en el progreso de la misma más que en la iniciación (Garima y Cols, 2012). Los lactobacilli son considerados bacterias cariogénicas, pero estudios *in vitro* y estudios clínicos fundamentan efectos beneficiosos en la salud oral (Badet, 2008).

Los lactobacilos son bacterias altamente acidogénicas y acidúricas, 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 (Twetman, 2012). En particular, los géneros de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, pueden ejercer efectos beneficiosos en la cavidad oral mediante la inhibición de *Streptococcus* y *Candidas* (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 y Cols, 2001; He y Cols, 2009).

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

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 y Cols, 2009).

Se puede concluir que los probióticos tienen un importante rol en la prevención de las enfermedades dentales, en específico de la caries. Sin duda alguna, esto se presenta como una efectiva vía terapéutica futura, en una época donde el desarrollo creciente de la resistencia antibiótica se presenta como problema. La colonización si se desarrolla a edad temprana, puede prevenir esta relevante patología pediátrica. Antes del establecimiento de esta medida preventiva, existen aún dudas sobre cuál es el mejor probiótico en la cavidad oral, dosis y momento de dosis, asegurando una disponibilidad mantenida en el medio oral, costo efectivo y fácil de administrar, para lo cual se requieren estudios longitudinales futuros (Garima y Cols, 2012).

En síntesis, considerando los efectos que los probiótico tienen sobre la salud oral y valorando los efectos directos que estas tienen sobre la placa dental,

produciendo antimicrobianos, interfiriendo sobre las proteínas y células que forman el biofilm compitiendo por sustrato, así como actuando indirectamente sobre el control de la cavidad oral, regulando la permeabilidad mucosa, generando presión selectiva sobre el desarrollo de la flora oral y modulando efectos sobre la función inmune sistémica como mejorando la inmunidad local (Mauli y Cols, 2012), es donde es necesario establecer si existen diferencias en la expresión de beta defensina humana 3 al incidir como variable el consumo de probióticos durante un plazo predefinido, 3 meses para nuestra propuesta investigativa, y compararlo con un grupo control.

3 HIPÓTESIS

Existen diferencias en la expresión de beta defensina humana 3 en preescolares que consumen regularmente leche enriquecida con probióticos en sus jardines infantiles después de tres meses de seguimiento.

4 OBJETIVO GENERAL

Establecer el efecto del consumo de leche con y sin lactobacilos en la concentración salival de Defensina Humana 3 a tres meses plazo.

5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5.1 Objetivo específico 1

Determinar expresión inicial y a 3 meses plazo de Beta Defensina humana 3 en grupo control.

5.2 Objetivo específico 2

Determinar expresión inicial y a 3 meses plazo de Beta Defensina humana 3 a grupo experimental.

5.3 Objetivo específico 3

Comparar la expresión de Beta Defensina huma 3 inicial y a 3 meses plazo entre grupo control y experimental.

6 METODOLOGÍA

Tipo de estudio e Intervención

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 de los jardines infantiles fueron instruidas respecto al monitoreo del consumo de leche por los niños. Además se realizaron capacitaciones a las manipuladoras de alimentos 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 organolépticas para evitar sesgo de selección.

6.1 Población Objetivo y Muestra

La población objetivo fue la población de niños y niñas de 2 a 3 años de edad que asistían a educación preescolar en establecimientos dependientes de la fundación INTEGRAL de la región metropolitana. A estos jardines infantiles asisten principalmente niños que pertenecen a familias en situación de pobreza y/o vulnerabilidad social.

6.1.1 Aspecto ético

El presente estudio fue presentado ante el comité de ética de la Dirección de investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile para su aprobación.

Adicionalmente, antes de comenzar la intervención, se presentó un documento

de consentimiento informado a los padres y/o responsables de los niños y niñas, el cual informaba sobre las implicancias y objetivos de esta investigación (Anexo nº1).

6.1.2 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.

6.1.3 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.

6.1.4 Construcción de grupos de investigación

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.

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.

6.2 Coordinación de trabajo de campo

Un coordinador de trabajo de campo dentro del equipo, mantenía 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.

6.3 Técnicas de recolección de la información

6.3.1 Exámenes clínicos

Exámenes clínicos fueron realizados al inicio y a los 3 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 e ICDAS con valores 5 y 6, al inicio de los periodos definidos de examen y los registrados a los 3 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 3 meses del estudio. Se alcanzaron valores clasificados como buen acuerdo (rango de índice Kappa 0,61-0,8).

6.3.2 Toma de muestra

Al inicio y a los 3 meses, a cada niño del estudio se le tomó una muestra de saliva con una pipeta para análisis bioquímico. 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.

6.3.3 Análisis bioquímico

Los niveles de beta defensina 3 en las muestras de saliva fueron determinados usando un kit comercial de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas o test de ELISA (US Biological, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Brevemente, las muestras a evaluar y la curva estándar fueron adicionadas a la placa recubierta con el anticuerpo de captura e incubadas por 1 hora. Luego de 4 lavados, se agregó el anticuerpo de detección anti-beta defensina 3 conjugado a biotina (dilución 1:100) y se incubó durante 1 hora. A continuación, se lavó nuevamente 4 veces y se trató con la enzima HRP-estreptavidina (1:100) durante 30 minutos. Luego de 5 lavados, se agregó el sustrato TBM y

se dejó de 10 a 15 minutos en la oscuridad. Finalmente, se detuvo la reacción usando solución de stop y se midió la absorbancia de la placa a 450nm en un espectrofotómetro. Las concentraciones mostradas se obtuvieron de una curva estándar interna generada para cada experimento.

6.3.4 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. El análisis de los datos se realizó con el programa estadísticos STATA.

7 Resultados

Se incorporaron al estudio 36 niños matriculados en los jardines seleccionados pertenecientes a la fundación INTEGRAL, cuyos apoderados asintieron con el consentimiento informado y cumplían con los criterios de inclusión. En cuanto a la descripción del total de la muestra según género, el 64% de la misma era femenina y 36% masculina. Luego del primer examen clínico (T0), se ajustaron los grupos de estudio en 44% libre de caries y 56% con presencia de lesiones de caries

Los 36 niños del total de la muestra estudiada tenían un promedio de 3 años de edad al momento de la medición (Ir a tabla 1). Dado que el plazo de la intervención fue de 3 meses (T1), se obvio el cambio en la edad promedio de la muestra estudiada así como la variación en su ceo/ICDAS durante el mismo periodo. En el tiempo basal (T0), al realizar el diagnóstico clínico el promedio de lesiones de caries en el total de la muestra es de 3,39 lesiones. La diferencia encontrada en la concentración salival de beta defensina humana 3 (pg/ml), entre la medición basal (T0), y a tres meses plazo (T1), evidencio una disminución en la misma estadísticamente significativa y su distribución fue normal (Tabla 1).

Tabla N° 1.- Resultados clínicos y bioquímicos en el total de la muestra

Grupo	Edad [^]	ceo/ICDAS	Concentración salival Beta Defensina Humana 3 (pg/ml)		
	N= 35	N=36	T0	T1	Diferencia (t0-t1)
Valores total muestra	3,05	3,39	372,00*	208,35*	163,65

T0= medición basal, T1= medición a 3 meses. Valores expresados como medias en picogramos por ml de solución. Las diferencias observadas entre ambos tiempos de estudios son estadísticamente significativas con un $p < 0,01$ (*). ceo/ICDAS: Índice CEO construido con los códigos 5 y 6 de ICDAS. Se desconoce edad de un sujeto muestral([^])

Al descomponer la muestra total en un grupo experimental consumidor de probióticos (16 sujetos), y grupo control (20 sujetos), nos encontramos con que la media de edad de ambos es cercana a los 3 años (Tabla 2). La cantidad de lesiones de caries ceo/ICDAS en ambos grupos no presenta diferencias estadísticamente significativas, exhibiendo en promedio 2,39 lesiones de caries más en el grupo control que en el consumidor de probióticos (Tabla 2).

El grupo control evidencia una disminución en la concentración de beta defensina humana 3 al observar la diferencia en la misma durante los 3 meses de la intervención comparable a la mitad de su valor durante el intervalo (T0-T1). En cuanto al grupo consumidor de probióticos, durante el mismo plazo muestra una diferencia de factor positivo, lo que indica una disminución en la secreción del péptido antimicrobiano salival durante el tiempo de la intervención (Tabla 2).

Tabla N° 2.- Resultados clínicos y bioquímicos en grupo experimental consumidor de probióticos y control

Grupo	Edad [^] N=35	ceo/ICDAS N=36	Concentración salival Beta Defensina Humana 3 (pg/ml) N=36			
			T0	T1	Diferencia (t0-t1)	
Experimental probiótico	16	2,98	2,06	316,13	246,91 [§]	69,27*
Control	20	3,11	4,45	416,67	177,50 [§]	239,19*

T0= medición basal, T1= medición a 3 meses. Valores expresados como medias en picogramos por ml de solución. Las diferencias observadas entre los grupos de estudios no son estadísticamente significativas con un $p < 0,01$ (*)([§]). Ceo/ICDAS: Índice CEO construido con los códigos 5 y 6 de ICDAS. Se desconoce edad de un sujeto muestral([^])

Al revisar los datos ajustados a la presencia o no de lesiones de caries entre los grupos experimental consumidor de probióticos y el control, se generaron

cuatro grupos no equitativos en su número de individuos desde el total de la muestra (Tabla 3). En cada uno de ellos la edad permanece cercana a los 3 años.

Tabla N° 3 Resultados clínicos y bioquímicos en grupo experimental consumidor de probióticos (3 meses) y control, libre de caries y con lesiones de caries

Grupo		N de individuos	Edad [^] N= 35	ceo/ICDAS N=36	Concentración salival Beta Defensina Humana 3 (pg/ml) N=36		
					T0	T1	Diferencia (t0-t1)
Experimental probiótico	Libre de caries	6	2,89	0	182,05	303 [§]	-120,95 [*]
	Con lesiones de caries	10	3,03	3,3	396,59	213,25 [§]	183,33 [*]
Control	Libre de caries	8	2,99	0	144,61	123,77 [§]	20,83 [*]
	Con lesiones de caries	12	3,19	7,41	598,08	213,32 [§]	384,75 [*]

T0= medición basal, T1= medición a 3 meses. Valores expresados como medias en picogramos por ml de solución. Las diferencias observadas entre los grupos de estudios no son estadísticamente significativas con un $p < 0,01$ (*)(§). Ceo/ICDAS: Índice CEO construido con los códigos 5 y 6 de ICDAS. Se desconoce edad de un sujeto muestral([^])

En cuanto a las diferencias en la concentración salival de beta defensina humana 3 entre T0 y T1, los individuos libres de caries del grupo experimental mostraron un aumento considerable en los valores de la misma, superior a cualquier otro subgrupo presente en la descomposición de datos extraídos de las tablas resultantes (Tabla 3).

Cabe mencionar que si bien todos los demás valores de concentración de HBD-3 expresados en la tabla manifiestan disminuciones entre el tiempo basal y 3 meses plazo, los individuos ajustados libres de caries en el grupo control exhibieron el menor valor de variación entre T0 y T1. En tanto a los individuos

con presencia de caries tanto en el grupo experimental como el control, disminuyeron su concentración salival de HBD-3 en casi la mitad de su valor para el grupo experimental y a un tercio para el control entre T1 y la medición basal T0 (tabla 3).

Al realizar un test para análisis de muestras no paramétricas (Test de Mann-Whitney), entre los 4 grupos resultantes, los grupos experimental y control ajustado por presencia de caries sus resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas en la concentración de HBD-3 en saliva.

8 Discusión

Si bien, al observar los resultados de la expresión de beta Defensina humana 3 en la saliva del total de los niños durante el tiempo de estudio, evidencian una disminución de la concentración de la misma semejante a la mitad de la expresión en T0 en comparación con T1, al descomponer la muestra en individuos pertenecientes al grupo de niños que consumió probióticos (experimental), y el grupo control, la tendencia a la disminución en la concentración de HBD-3 salival se mantiene en ambos grupos, mas, el grupo experimental evidencia una disminución considerablemente menor durante el plazo de estudio frente al grupo control que diferencia prácticamente la mitad de su valor entre el basal y los 3 meses.

Sin embargo, esta diferencia pese a estar muy cerca del valor P requerido, no logra ser estadísticamente significativo ($P=0,09$). Complementado dicha idea, si vamos a la tabla 3 donde los grupos experimental y control son ajustados a individuos libres de caries o con presencia de caries, sólo el grupo experimental libre de caries expresó un aumento de la concentración de HBD-3 durante el plazo de estudio. Los demás grupos disminuyeron sus concentraciones, siendo el control libre de caries el que mostro la menor variación.

Notamos que cada subdivisión muestra una tendencia estadística que si bien exhibe diferencias entre los grupos, aun no logran valores que nos permitan establecer la significancia estadística propiamente tal. Esto nos hace pensar que HBD-3 como péptido antimicrobiano salival juega un rol dentro de la respuesta inmune innata actuando frente al desbalance microbiano del ecosistema bucal bajo cierto rango habitual de concentración fisiológico micromolar, que deja de expresarse cuando la microbiota oral excede las capacidades del sistema de hacerse cargo del factor bacteriano por si sola, como ocurriría en la enfermedad de caries. Luego, el consumo de probióticos contribuiría a mantener la homeostasis de este mecanismo del sistema inmune innato cuando la enfermedad está consolidada de tal forma que sobrepasa la capacidad del mismo de hacerse cargo de la infección.

En relación a otras patologías se sabe que elevadas concentraciones de sal en el tracto respiratorio de pacientes con fibrosis quística inactivarían la actividad antimicrobiana de algunas beta defensinas (18,35), posiblemente al alterarse la unión de las defensinas a las superficies bacterianas negativamente cargadas. Por otro lado, otras investigaciones indican que a diferencia de otras beta defensinas, la HBD-3 no es sensible a los cambios en concentraciones fisiológicas de sal (Harder y cols, 2001).

Si revisamos las diferentes tablas, notamos que el grupo experimental y control al ajustarse por presencia o libre de caries no son iguales, mas, la relación en cuanto número y proporción de individuos entre ambos grupos es similar. Sobre esto, valoramos la representatividad de la muestra estudiada que adicionalmente en cada uno de sus subgrupos exhibe promedios de edades cercanas a los tres años para los individuos de la muestra brindándonos argumentos que sostienen la validez interna de la misma. Por otro lado, entre los subgrupos con presencia o libres de caries tanto en el grupo experimental como el control, existe una diferencia de 4,11 lesiones. En este sentido, existe discusión entre la interdependencia del péptido antimicrobiano y la enfermedad de caries. Estudios nos hablan de que la concentración de HBD-3 salival es altamente variable entre sujetos, sin correlación entre activos y libres de caries

(Phattarataratip y Cols, 2010). Otro estudio realizado en 149 niños entre 11 y 15 años, con y sin caries, se encontró que los niveles de HBD-3 y LL-37 en saliva no estimulada no se correlaciona con la experiencia de caries (Tao y Cols, 2005). Luego la diferencia entre los ceo/ICDAS de los sujetos con presencia de lesiones de caries del grupo experimental y el control (3,3 y 7,41 respectivamente), no implicarían un sesgo en los resultados.

Si bien, nuestro trabajo encontró diferencias en la expresión de HBD-3 entre la subdivisión caries y libres de caries del grupo experimental, no logró ser estadísticamente significativo, dada la limitante del acotado tiempo de estudio y número de sujetos de estudio de la muestra, siendo un tope de nuestra metodología que nos hace pensar que atendiendo dichas observaciones nos permitirían llegar a la significancia estadística sin otra variable que así no lo permita.

Destacamos que no se presentaron efectos secundarios en el grupo experimental relacionados con el consumo de probióticos durante el periodo de experimentación. Esto se pudo determinar con el reporte por parte de los apoderados, que no acusaron ningún inconveniente relacionado con la leche ingerida por sus pupilos.

Nuestros datos provienen del análisis de ensayos inmunoenzimáticos de muestras de saliva de los niños en estudio, a sabiendas de que la literatura señala que la expresión de HBD-3 proviene principalmente de las estructuras epiteliales de la cavidad oral, glándulas salivales, encías y lenguas, siendo controversial el verdadero efecto de la influencia de la condición inflamatoria local en la expresión de HBD-3 dado análisis de RT-PCR que han detectado expresión de HBD-3 en tejidos orales no inflamados y valores bajos para la expresión del mRNA de todas las defensinas (1 a 3) en tejidos inflamados (Dunsche y Cols, 2002), difiriendo de otros estudios, donde la expresión de HBD-3 es inducida por citoquinas, así como por bacterias (García y Cols, 2001;

Harder y Cols, 2001; Jia y Cols, 2001), factor cual para el caso de esta investigación no fue considerada como variable

Nuestro trabajo no valoró el perfil microbiológico cariogénico y su influencia sobre la expresión de HBD-3 a la hora de ajustar los grupos de la muestra, lo cual probablemente hubiese aportado antecedentes relevantes para las conclusiones del mismo dado el demostrado efecto de los péptidos antimicrobianos salivales sobre el ecosistema bucal, restringiendo el crecimiento y desarrollo de biofilm cariogénicos (Phattarataratip y Cols, 2010).

En este sentido, no está bien definido si una disminución en la expresión de HBD-3 o una deficiencia cualitativa en ella podrían derivar en el éxito de supervivencia de estos patógenos y la progresión de la enfermedad. Estudios *in vitro* indican que el desarrollo de la resistencia microbiana se produciría cuando son expuestas a concentraciones subletales de HBD-3 (Shelburne y cols, 2005), valor estudiado en algunos estudios mediante técnicas de dosis letal virtual y citometría de flujo pero aún no bien definido (Nuding y cols, 2006)

Está establecido que la vía de administración láctea es la más adecuada para proporcionar probióticos a los niños dada la familiaridad del producto con la dieta habitual de los infantes y los beneficios nutritivos propios de la misma, la leche por si tiene un efecto sobre el ecosistema bucal que podría influir sobre la expresión de péptidos antimicrobianos salivales que desconocemos. De momento, la literatura ya describe para ella efectos tales como capacidad buffer de los ácidos originados por las bacterias en la cavidad oral, posee calcio, lactato de calcio y otros componentes orgánicos e inorgánicos con efecto anticariógeno y que reducen la colonización por patógenos (Garima y Cols, 2012). Por otro lado, los momentos en que se proveía el probiótico fueron seleccionados en nuestra investigación según criterios prácticos para la ejecución del mismo, en base a los horarios de asistencia y hábitos de los preescolares más que sobre fundamentos de eficiencia en cuanto dosis y administración de la variable experimental probiótica.

Si bien los resultados obtenidos no alcanzan la significancia estadística, las diferencias encontradas sobre la expresión de HBD-3 entre los grupos experimental y control, no es posible saber si se deben al efecto inmunomodulador del probiótico sobre el organismo o como consecuencia de la disminución del recuento celular y formación de biofilm cariogénico que *L. rhamnosus* produce. Esto dado estudios que muestran que 4 *Lactobacillus*, comúnmente utilizados como probióticos, incluyendo *L. rhamnosus*, interfieren con la formación de biofilm con *S. mutans* in vitro (Söderling y Cols, 2010), lo que alteraría la inducción de la expresión de HBD-3.

Se requiere mayor recopilación de evidencia científica para establecer la relación entre el consumo de probióticos y su efecto sobre la expresión de beta Defensina humana 3. Sólo así determinar su valor como herramienta predictora de riesgo de caries, complemento al diagnóstico y/o agente terapéutico.

9 Conclusiones

No existen diferencias estadísticamente significativas en la expresión de beta defensina humana 3 en preescolares que consumen regularmente leche enriquecida con probióticos en sus jardines infantiles después de tres meses de seguimiento.

El grupo experimental libre de caries es el único grupo que mostró aumento en la expresión de beta Defensina humana 3 después de tres meses plazo.

No se reportaron efectos secundarios en el grupo experimental por el consumo regular de leche enriquecida con probióticos.

Los datos obtenidos sobre la relación entre la concentración salival de HBD-3 y riesgo de caries son insuficientes para determinar su valor como herramienta predictora de la enfermedad, así como complemento al diagnóstico.

Se requiere mayor recopilación de evidencia científica para establecer la relación entre el consumo de probióticos y su efecto sobre la expresión de beta Defensina humana 3, en vista de establecer su como agente terapéutico contra la enfermedad de caries.

10 Referencias bibliográficas

Amid I., Woosung S. (1999) A Systematic Review of Clinical Diagnostic Criteria of Early Childhood Caries. *J Public Health Dent* 59(3):171-91.

Abiko Y, Nishimura M, Kaku T. Defensins in saliva and the salivary glands. *Med Electron Microsc.* 2003;36(4):247-52.

Badet C, Thebaud N B. (2008) Ecology of lactobacilli in the oral cavity: A review of literature. *The Open Microbiology Journal* 2:38-48.

Bals R, Wilson JM. Cathelicidins--a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(4):711-20.

Bartie KL, Devine DA, Wilson MJ, Lewis MA. In vitro susceptibility of the Streptococcus milleri group to antimicrobial peptides. *IntEndod J.* 2008;41(7):586-92.

Beighton D (2009). Can the ecology of the dental biofilm be beneficially altered? *AdvDent Res* 21(1):69-73.

Binks MJ, Fernie-King BA, Seilly DJ, Lachmann PJ, SriprakashKS. Attribution of the various inhibitory actions of the streptococcal inhibitor of complement (SIC) to regions within the molecule. *J Biol Chem.* 2005;280(20):20120-5.

Bowen WH, Koo H. Biology of Streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011;45(1):69-86.

Caglar E, Kargul B, Tanboga I (2005). Bacterio therapy 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) Samplesize 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

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.

Dale B, Tao R, Kimball J, Juveric R (2006) Oral antimicrobial peptides and biological control of caries. *BMC Oral Health*. 1(13); 1-17

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

De Smet K, Contreras R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett*. 2005;27(18):1337-47.

Diamond G, Beckloff N, Ryan LK. Host defense peptides in the oral cavity and the lung: similarities and differences. *J Dent Res*. 2008;87(10):915-27.

Diamond G, Ryan LK (2011) Beta-defensins: What they really doing in the oral cavity. *Oral Diseases*. 17; 628-635

Dunsche A, Açil Y, Dommisch H, Siebert R, Schröder JM, Jepsen S. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *Eur J Oral Sci*. 2002;110(2):121-4.

Diamond G, Beckloff N, Weinberg A, Kisich KO. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr Pharm Des*. 2009;15(21):2377-92.

Dhople V, Krukemeyer A, Ramamoorthy A. The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758(9):1499-512.

Edgerton M, Koshlukova SE. Salivary histatin 5 and its similarities to the other antimicrobial proteins in human saliva. *Adv Dent Res*. 2000;14:16-21.

Feng Z, Jiang B, Chandra J, Ghannoum M, Nelson S, Weinberg A. Human beta-defensins: differential activity against candidal species and regulation by *Candida albicans*. *J Dent Res*. 2005;84(5):445-50.

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

Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(9):710-20.

Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *C R Biol.* 2004;327(6):539-49.

García JR, Jaumann F, Schulz S, Krause A, Rodríguez-Jiménez J, Forssmann U, et al. Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res.* 2001;306(2):257-64.

Garima J, Kumar R, Kumar R, Pandey N, Can early exposure to probiotics in children prevent dental caries? A current perspective. *J Bio and Cranio Res.* 2012;2(2) 110-115

Goebel C, Mackay LG, Vickers ER, Mather LE. Determination of defensin HNP-1, HNP-2, and HNP-3 in human saliva by using LC/MS. *Peptides.* 2000;21(6):757-65.

Gomes PeS, Fernandes MH. Defensins in the oral cavity: distribution and biological role. *J Oral Pathol Med.* 2010;39(1):1-9.

Gold, O. G., Jordan, H. V., & Van Houte, J. (1973). A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 18(11), 1357-1364

Gordon YJ, Huang LC, Romanowski EG, Yates KA, Proske RJ, McDermott AM. Human cathelicidin (LL-37), a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity. *Curr Eye Res.* 2005;30(5):385-94.

Hancock RE. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis.* 2001;1(3):156-64.

Hahn CL, Liewehr FR. Innate immune responses of the dental pulp to caries. *J Endod.* 2007;33(6):643-51.

Hahn CL, Liewehr FR. Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. *J Endod.* 2007;33(7):773-81.

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta - defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem.* 2001;276(8):5707-13.

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

Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 1). *J Clin Pediatr Dent*. 2003;28(1):47-52.

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.

Hojo. K, Nagaota S, Oehshima T, Maeda N. Bacterial interaction in dental biofilm Development (2009) *J Dent Res* 88:982

Horowitz H.S. (1998) Research issues in early childhood caries. *Community Dent Oral Epidemiol* 26: Supplement 1: 67-81.

Jia HP, Schutte BC, Schudy A, Linzmeier R, Guthmiller JM, Johnson GK, et al. Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene*. 2001;263(1-2):211-8.

Joly S, Maze C, McCray PB, Guthmiller JM. Human beta-defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. *J Clin Microbiol*. 2004;42(3):1024-9.

Kidd E. (2004) How clean must a cavity be before restoration? *Caries Research* 38:305-313.

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.

Lazar V (2010) Quorum sensing in biofilms - How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? 1(3); 280-285

Loesche WJ (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 50: 353-380

Maul S, Parampreet K, Virat G (2012) Probiotics-A new way to maintain oral health. *Indian Journal of dentistry* 3(2); 77-88

Maisetta G, Batoni G, Esin S, Raco G, Bottai D, Favilli F, et al. Susceptibility of *Streptococcus mutans* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to bactericidal activity of human beta-defensin 3 in biological fluids. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(3):1245-8.

Meurman JH (2005). Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *Eur J Oral Sci* 113(3):188-196.

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.

Lee JK, Chang SW, Perinpanayagam H, Lim SM, Park YJ, Han SH, et al. Antibacterial efficacy of a human β -defensin-3 peptide on multispecies biofilms. *J Endod*. 2013;39(12):1625-9

Ouhara K, Komatsuzawa H, Yamada S, Shiba H, Fujiwara T, Ohara M, et al. Susceptibilities of periodonto pathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, {beta}-defensins and LL37, produced by human epithelial cells. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55(6):888-96.

Pereira A, Neves A, Trindade A (2010) Imunologia da cárie. *Acta Med Port*;23:663-668

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

Pütsep K, Carlsson G, Boman HG, Andersson M. Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study. *Lancet*. 2002;360(9340):1144-9.

Phattarataratip E, Olson B, Broffitt B, Qian F, Brogden KA, Drake DR, et al. *Streptococcus mutans* strains recovered from caries-active or caries-free individuals differ in sensitivity to host antimicrobial peptides. *Mol Oral Microbiol*. 2011;26(3):187-99.

Raj PA, Dentino AR. Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiol Lett*. 2002;206(1):9-18.

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 or early childhood caries. *Community Dent Oral Epidemiol* 26: Supplement 1:8-27.

Shelburne, W.A. Coulter, D.A. Olguin, M.S. Lantz, D.E. Lopatin, (2005). Induction of β -defensin resistance in the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 183–187.

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

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

Svinarich DM, Wolf NA, Gomez R, Gonik B, Romero R. Detection of human defensin 5 in reproductive tissues. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;176(2):470-5.

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.

Taggart CC, Greene CM, Smith SG, Levine RL, McCray PB, O'Neill S, et al. Inactivation of human beta-defensins 2 and 3 by elastolytic cathepsins. *J Immunol.* 2003;171(2):931-7.

Tani K, Murphy WJ, Chertov O, Salcedo R, Koh CY, Utsunomiya I, et al. Defensins act as potent adjuvants that promote cellular and humoral immune responses in mice to a lymphoma idio type and carrier antigens. *Int Immunol.* 2000;12(5):691-700.

Tao R, Jurevic RJ, Coulton KK, Tsutsui MT, Roberts MC, Kimball JR, et al. Salivary antimicrobial peptide expression and dental caries experience in children. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(9):3883-8.

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, Steckslen-Blicks C (2008). Probiotics and oral health effects in children. *Int J Paediatr Dent* 18(1):3-10

Yee R, Sheiman A. (2002)The burden of restorative dental treatment for children in third world countries. *International Dental Journal* 52:1-9.

Song W, Shi Y, Xiao M, Lu H, Qu T, Li P, et al. In vitro bactericidal activity of recombinant human beta-defensin-3 against pathogenic bacterial strains in human tooth root canal. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33(3):237-43.

Shelburne CE, Coulter WA, Olguin D, Lantz MS, Lopatin DE. Induction of {beta}-defensin resistance in the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(1):183-7.

Schibli DJ, Hunter HN, Aseyev V, Starner TD, Wiencek JM, McCray PB, et al. The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*. 2002;277(10):8279-89.

Sahasrabudhe KS, Kimball JR, Morton TH, Weinberg A, Dale BA. Expression of the antimicrobial peptide, human beta-defensin 1, in duct cells of minor salivary glands and detection in saliva. *J Dent Res*. 2000;79(9):1669-74.

Underwood MA, Bevins CL. Defensin-barbed innate immunity: clinical associations in the pediatric population. *Pediatrics*. 2010;125(6):1237-47.

Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res*. 2004;38(3):247-53.

Wu Z, Hoover DM, Yang D, Boulègue C, Santamaria F, Oppenheim JJ, et al. Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(15):8880-5.

Wu Z, Ericksen B, Tucker K, Lubkowski J, Lu W. Synthesis and characterization of human alpha-defensins 4-6. *J Pept Res*. 2004;64(3):118-25.

Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002;415(6870):389-95.

Zhu C, Tan H, Cheng T, Shen H, Shao J, Guo Y, et al. Human β -defensin 3 inhibits antibiotic-resistant *Staphylococcus* biofilm formation. *J Surg Res*. 2013;183(1):204-13.

11 Anexo

Nº1

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PADRES Y/O APODERADOS

Este formulario de consentimiento informado es para padres de niños(as) del Jardín Infantil ..., de la comuna de..., y a quienes les vamos a invitar a participar en una investigación organizada por la Universidad de Chile con la participación de la Fundación Integra, denominada “Efecto de bebidas lácteas enriquecidas con probióticos lactobacilos en reducción de incidencia de caries en niños preescolares”.

Este estudio tiene por objetivo evaluar el efecto del consumo de probióticos para prevenir las caries. Queremos invitar a su hijo(a) a participar en este estudio, que consistirá en una primera etapa, en hacerles una evaluación odontológica basal y tomar una muestra de saliva. Luego el jardín recibirá gratuitamente bebidas lácteas con probióticos o sin ellos por parte de SOPROLE. Ambos productos corresponden a productos comercialmente disponibles en nuestro país. Se decidirá por azar el tipo de bebida láctea que recibirán los jardines y por lo tanto su hijo. En una segunda etapa, los niños serán nuevamente revisados en el jardín (a los 12 meses y a los 24 meses) y se les solicitarán nuevas muestra de saliva. El examen de salud es muy simple y sólo incluye la observación de los dientes. La muestra de saliva consiste en tomar saliva desde la boca del niño y esta será empleada únicamente para análisis microbiológicos en el marco de este estudio.

La participación de su hijo(a) en este estudio, es muy importante, ya que podrá contribuir al conocimiento científico, y de esta manera ayudar a la salud oral de los niños de nuestro país. Esto no tendrá ningún costo para usted y no producirá molestias a su hijo(a).

La información que obtengamos será conservada en estricta confidencialidad y solo tendrá acceso a ella el grupo investigador. La publicación de los resultados será totalmente anónima. Si usted desea conocer la información obtenida de su hijo o pupilo sólo debe solicitarla por escrito en el jardín y nosotros le haremos llegar la información y recomendaciones.

La participación en este estudio es totalmente voluntaria y si usted desea, puede retirar a su hijo(a) en cualquier momento y no se perjudicará de ninguna manera.

Si usted requiere cualquier otra información puede comunicarse con los investigadores de este proyecto: El señor Rodrigo Cabello Ibacache, o al señor Gonzalo Rodríguez o al señor Iván Urzúa al teléfono 02-9781742.

Si usted ha entendido y quiere acceder por favor escriba el siguiente texto en el espacio establecido para esto.

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, yo (escriba su nombre) otorgo mi consentimiento para que mi hijo o mi hija (escriba el nombre de su hijo o hija) participe en el proyecto.

Nombre participante

Nombre del Padre/Madre
o Apoderado

Firma

Fecha