

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE GRADUADOS
MAGISTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
MENCIÓN CARIOLOGÍA**



Efecto del consumo de leche enriquecida con probióticos lactobacilos en la concentración salival de Beta Defensina Humana 3 en niños pre-escolares. Ensayo clínico randomizado por conglomerados, triple ciego.

Nombre del Alumno: María Francisca Sandoval Valdés

**TRABAJO DE INVESTIGACION
REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

TUTOR PRINCIPAL

Nombre: Dra. Simone Faleiros Ch.

TUTORES ASOCIADOS

Nombre: Dr. Rodrigo Cabello I.

Dr. Gonzalo Rodríguez M.

Dr. Alejandro Escobar A.

Santiago, Chile Mayo 2015

INDICE.

1. Introducción	1
2. Antecedentes Bibliográficos	3
2.1 Caries Dental	3
2.1.a Caries temprana de la infancia	4
2.2 Saliva y función protectora	6
2.2.a Componentes de la saliva	6
2.2.b Funciones de la saliva	7
2.3 Péptidos antimicrobianos	7
2.3.a Defensinas	9
2.4 β -Defensina Humana 3	11
2.5 β -Defensina humana 3 y caries	16
2.6 Probióticos	18
2.6.a Origen y vehículos de distribución de probióticos	19
2.6.b Aplicación de los probióticos a la salud oral	21
3. Hipótesis	27
4. Objetivo general	27
5. Objetivos específicos	27
6. Metodología	28
6.1 Diseño	28
6.2 Aspectos éticos	29
6.3 Muestra	30
6.4 Intervención	32
6.5 Toma de muestras	33
7. Análisis estadístico	36
8. Resultados	37
9. Discusión	44
10. Conclusión	52
11. Sugerencias	53
12. Resumen	54

13. Antecedentes bibliográficos	56
14. Anexos	67

1. INTRODUCCIÓN.

En los últimos años existe una creciente evidencia que las bacterias probióticas poseen un efecto en el balance de los microorganismos en humanos y consecuentemente en su salud. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), los probióticos se definen como microorganismos vivos, principalmente bacterias, que son seguros para el consumo humano, y que ingeridos en cantidades suficientes, tienen efectos beneficiosos sobre la salud (Meurman and Stamatova, 2007).

Distintos trabajos han utilizado cepas probióticas para la prevención de enfermedades orales (Cagetti *et al.*, 2013). En este sentido los probióticos han sido administrados para mantener o restaurar la flora normal en contra de la invasión de bacterias patógenas, responsables de las caries y la enfermedad periodontal (Saha *et al.*, 2012).

Los probióticos poseen múltiples acciones, demostradas a nivel intestinal, como la prevención de la adhesión e invasión de bacterias patógenas, modificando el ambiente intestinal y modulando la respuesta inmune tanto local como sistémica (Floch *et al.*, 2011). En este contexto el consumo de probióticos, a nivel intestinal, modula la inmunidad innata, donde se produce la estimulación de la síntesis de Beta-Defensina Humana 2 (H β D-2) (Schlee *et al.*, 2007, Wehkamp *et al.*, 2004). Este péptido antimicrobiano, al igual que la Beta-Defensina Humana 3 (H β D-3), participa como la primera barrera de defensa en contra de la colonización bacteriana, debido a su efecto microbicida de amplio espectro en contra de virus, bacterias y hongos (Ganz, 2003). La H β D-3 se destaca dentro de las Beta-defensinas por poseer la mayor potencia de acción antibacteriana, y se ha encontrado distribuida ampliamente

en los epitelios orales de encía, lengua, glándulas salivales y mucosa bucal, y al igual que la H β D-2, son inducidas por la presencia de bacterias, sus componentes bacterianos y mediadores de la inflamación (Harder *et al.*, 2001, Dhople *et al.*, 2006).

A nivel de salud oral se ha demostrado, *in vitro*, que la H β D-3 posee acción antibacteriana en contra de los principales patógenos orales (Ouhara *et al.*, 2005, Maisetta *et al.*, 2005, Madhwani and McBain, 2012), sin embargo, no se conoce si la expresión de H β D-3 se ve afectada por el consumo de cepas probióticas. El objetivo de este estudio es determinar en un grupo de pre-escolares la concentración salival de H β D-3, después de 14 meses, de consumo regular de leche enriquecida con *Lactobacillus rhamnosus* SP1, y establecer si los niveles en saliva de este péptido se ven modificados en comparación con un grupo de pre-escolares que no consumió el probiótico.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

2.1 CARIES DENTAL.

La caries dental es la destrucción localizada de los tejidos mineralizados del diente por ácidos provenientes de la fermentación de hidratos de carbono por parte de las bacterias patógenas, donde el proceso de la enfermedad es iniciado dentro del biofilm bacteriano que cubre la superficie dentaria. La caries es una enfermedad multifactorial que parte con cambios microbiológicos dentro del complejo biofilm y es afectada por el flujo y la composición salival, el consumo de hidratos de carbono y por hábitos preventivos, como el cepillado dental y la exposición a fluoruros (Selwitz *et al.*, 2007). La enfermedad es reversible en etapas tempranas y puede ser detenida en cualquier estado, incluso cuando la dentina y el esmalte son cavitados o destruidos, siempre y cuando se elimine o remueva eficientemente el biofilm (Selwitz *et al.*, 2007). Este biofilm o biopelícula está constituido por múltiples microorganismos, los cuales son encapsulados en una matriz orgánica de polisacáridos y proteínas secretadas por estos microorganismos, el cual entrega protección en contra de las defensas del hospedero y predadores, aumentando además la resistencia a los agentes antimicrobianos. El diente ofrece superficies que no ponen resistencia a la colonización microbiana y un largo número de bacterias y sus productos se acumulan en esta biopelícula en salud y enfermedad (Scheie and Petersen, 2004). Las bacterias cariogénicas tales como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus* spp, entre muchas otras, son capaces de producir ácidos débiles en el biofilm producto del metabolismo de carbohidratos fermentables. El

ácido causa una disminución en el valor del pH, por debajo del valor crítico de 5,5, pH en el cual se produce la desmineralización del tejido dentario (Featherstone, 2004, Bowen and Koo, 2011).

2.1.a Caries temprana de la infancia.

La caries dental es un problema de salud pública y una enfermedad altamente prevalente en Chile y el mundo. Según estudios del Ministerio de Salud (Ceballos y Acevedo 2007), en la Región Metropolitana los niños de 2 años poseen un índice ceod en promedio de 0,54 y una prevalencia de caries de aproximadamente el 17%. Adicionalmente los niños de 4 años tienen un ceod promedio de 2,32 y la prevalencia es del 48% (Ceballos y Acevedo 2007). En vista de estos resultados, el abordaje de la enfermedad de caries, en este grupo etáreo, debe estar orientado a prevenir su aparición y al control de los factores etiológicos de la enfermedad, ya que el tratamiento restaurador clásico, no es capaz de resolver el problema de la rápida aparición de lesiones de caries, con los consiguientes gastos económicos y sociales que esto conlleva (Featherstone, 2003).

La enfermedad se manifiesta, en el grupo de pre-escolares, generalmente en una forma particular y agresiva denominada caries temprana de la infancia (CTI), y se refiere a cualquier signo de caries en dentición temporal. Como resultado de la instalación de esta patología las secuelas incluyen la destrucción completa de los dientes afectados, teniendo como consecuencias; dolor, infecciones agudas, trastornos fonoaudiológicos y alteraciones nutricionales,

donde además el tratamiento puede tener un alto costo económico (Asociación Americana de Odontología Pediátrica, AAPD, 2011).

Aunque la CTI se relaciona estrechamente con grupos cercanos a la pobreza, el daño acumulado en aquellos niños con experiencia de caries, independiente del nivel de ingresos de su familia, se manifiesta en un gran número de dientes afectados y lesiones de caries que se encuentran generalmente sin tratamiento (Tinanoff *et al.*, 2002). Además la presencia de caries en etapa pre-escolar es un indicador de riesgo para el desarrollo de futuras lesiones en los dientes permanentes (Peretz *et al.*, 2003).

El tratamiento de CTI, debe estar enfocado en la remoción y posterior restauración de los tejidos afectados, la aplicación de sellantes en surcos profundos de dientes sanos y de barniz de flúor así como también de la modificación de hábitos de consumo de hidratos carbono y de técnica de cepillado para la eliminación mecánica del biofilm acumulado sobre las superficies dentarias (Peretz *et al.*, 2003). Siendo de gran importancia la capacidad que posea el odontólogo de identificar los factores de riesgo individuales que posee el paciente para evitar la instalación de esta patología.

Numerosas investigaciones (Fontana *et al.*, 2009, Featherstone, 2003, Dale *et al.*, 2006) han buscado 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 esta patología, que involucra la remoción del tejido desmineralizado e infectado, no

elimina los factores de riesgo de la enfermedad, por esto, lo lógico sería que las nuevas terapias fueran orientadas a la eliminación de los agentes etiológicos mediante la modulación de las especies presentes en el biofilm, por ejemplo, por componentes provenientes de la saliva (Featherstone *et al.*, 2003).

2.2 SALIVA Y FUNCIÓN PROTECTORA.

2.2.a Componentes de la saliva.

El fluido salival es una secreción exocrina, que contiene aproximadamente 99% de agua, conteniendo una variedad de electrolitos (sodio, potasio, calcio, cloruro de magnesio, bicarbonato, fosfato) y proteínas, representado por enzimas, inmunoglobulinas y otros factores antimicrobianos, glicoproteínas mucosas, trazas de albúmina y algunos polipéptidos y oligopéptidos de importancia para la salud oral (de Almeida *et al.*, 2008). La saliva total se refiere a la compleja mezcla de fluidos provenientes de las glándulas salivales, el fluido crevicular, trasudado de la mucosa oral, además de la mucosa de cavidad nasal y la faringe, bacterias no adheridas, restos de alimentos, células epiteliales descamadas, así como trazas de medicamentos o productos químicos (Kaufman and Lamster, 2002).

En reposo, sin estimulación exógena o farmacológica hay un flujo continuo de saliva, que se denomina flujo salival sin estimular, el cual está presente en forma de una película que cubre, hidrata y lubrica los tejidos bucales. La saliva estimulada se produce en respuesta a estímulos mecánicos, gustativos, olfativos o farmacológicos, contribuyendo alrededor del 80% a 90% de la producción diaria salival (Humphrey and Williamson, 2001).

2.2.b Funciones de la saliva.

La cavidad oral representa un ambiente único, en el cual una amplia cantidad de microorganismos habitan el biofilm oral y por su localización interactúan directamente con la saliva. El sistema de defensa salival juega un importante rol en la mantención de la salud en la cavidad oral y en la prevención de caries (Van Nieuw Amerongen *et al.*, 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. Esto se basa en numerosos estudios que reportan el aumento de la incidencia de caries en pacientes con disminución en su flujo salival, ya sea por enfermedades, medicamentos o por terapias de radiación (Olate *et al.*, 2014, Abbate *et al.*, 2014, Srinivasulu *et al.*, 2014).

Los mecanismos de defensa salivales son numerosos e incluyen producción local y sistémica de inmunoglobulinas, lisozima, mucinas, y péptidos antimicrobianos (de Almeida *et al.*, 2008).

2.3 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS.

El rol potencial de las proteínas salivales y dentro de éstas, los péptidos antimicrobianos, han sido objeto de múltiples investigaciones (Phattarataratip *et al.*, 2011). 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 (Ganz, 2003, Zasloff, 2002).

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

Estos péptidos pueden ser particularmente importantes en la cavidad oral, donde la microflora bacteriana está presente en un alto número todo el tiempo. Existen 3 principales familias de péptidos antimicrobianos, que se definen por la composición aminoacídica y por su estructura tridimensional; las catelicidinas o LL-37, las histatinas y las defensinas (Abiko *et al.*, 2003).

Las catelicidinas o LL-37, son péptidos de estructura alfa helicoidal sin cisteína (Bals and Wilson, 2003). Sólo una catelicidina ha sido identificada en humanos, la cual es un péptido antimicrobiano 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 *et al.*, 2005).

Las histatinas, corresponden a una familia de proteínas catiónicas de bajo peso molecular, ricas en histidina que son 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 and Koshlukova, 2000, De Smet and Contreras, 2005, Ganz, 2003).

Las defensinas, son péptidos pequeños (3-6kDa), con tres puentes disulfuro, altamente básicos y ricos en cisteínas (Joly *et al.*, 2004, Bartie *et al.*, 2008), que cumplen una función efectora en la inmunidad innata (Ganz, 2004).

2.3.a Defensinas.

Las defensinas juegan un importante rol en la inmunidad humana ya que se expresan en múltiples tejidos, y pueden encontrarse en condiciones de salud así como también en estados infecciosos o inflamatorios (Ganz, 2003). Estas moléculas se presentan dentro del rango de concentraciones micromolar y son ampliamente expresadas por epitelios así como por neutrófilos (Ganz, 2004).

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, 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 (Diamond *et al.*, 2009). Estos péptidos pueden funcionar como nexo entre la inmunidad innata y adquirida ya que provocan la quimiotaxis de linfocitos, células dendríticas inmaduras y linfocitos T, y además potencian la producción de anticuerpos (Tani *et al.*, 2000).

Las defensinas pueden ser divididas en α y β defensinas, y el interés que ha generado su estudio está basado en su potente actividad antimicrobiana, su amplio espectro de acción, el sinergismo y co-expresión con otros antimicrobianos en saliva y la estimulación del sistema inmune adquirido (Dale *et al.*, 2006), además tienen ventajas en relación a los antibióticos comunes, siendo capaces de

actuar en contra de algunos patógenos que han desarrollado resistencia antibiótica (Hancock, 2001).

Las α -defensinas son péptidos de 29 a 35 aminoácidos y son más cortos que las β -defensinas las cuales constan de 38 a 45 residuos (Raj and Dentino, 2002). 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 tres puentes disulfuro (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 la ubicación de los enlaces disulfuro, los cuales son responsables del emparejamiento de cisteínas (Gomes and 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 en el intestino y en el tracto genitourinario (Svinarich *et al.*, 1997, Wu *et al.*, 2004). En saliva total han sido identificadas las HPN-1, 2 y 3, donde tienen como función la muerte no oxidativa de microorganismos (Goebel *et al.*, 2000). Estas defensinas han sido además identificadas en el fluido crevicular donde son producidas por los neutrófilos que migran desde el torrente sanguíneo a la cavidad bucal (Abiko *et al.*, 2003). Existen 3 tipos de β -defensinas humana (H β D1-3) (Ryan *et al.*, 2003, Duits *et al.*, 2002), en saliva se expresan predominantemente las tres β -defensinas, y son producidas por las células epiteliales. Las H β D1-3 han sido

detectadas en glándulas salivales, encía, lengua y mucosa bucal (Harder *et al.*, 2001). H β D-1 es expresada principalmente de manera constitutiva (Sahasrabudhe *et al.*, 2000), aunque también puede ser inducida, pero en muy bajas concentraciones, mientras las H β D-2 y H β D-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 *et al.*, 2001, Dhople *et al.*, 2006). En general, se ha observado que la H β D-2 y H β D-3 son inducidas *in vitro* en células epiteliales de mucosa y encía en respuesta a la mayoría de los patógenos orales descritos hasta la fecha (Diamond *et al.*, 2008).

La expresión de las β -defensinas puede ser por estimulación directa por los patógenos orales y también pueden ser inducidas por citoquinas pro-inflamatorias que incluyen interleuquina (IL1)- β , factor de necrosis tumoral (TNF)- α e 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 *et al.*, 2008, Diamond *et al.*, 2009).

2.4 β -DEFENSINA HUMANA 3.

Expresión y regulación

El análisis de la expresión de H β D-3 en distintos órganos del cuerpo, a través de RT-PCR indicó presencia de mRNA de H β D-3 en la piel, tráquea, lengua, amígdalas, útero, riñones, la médula ósea, el timo, el colon, el estómago,

las adenoides, faringe y laringe. A nivel oral el RT-PCR detectó expresión de H β D-3 en las glándulas salivales y en tejidos orales inflamados y no inflamados (Dunsche *et al.*, 2002).

Todas las defensinas se sintetizan como pro-péptidos y son procesadas en distintos grados dependiendo de su lugar de expresión. Los genes de las defensinas humanas se agrupan en una región del cromosoma 8p22-p23, menor a 8 Mb (Harder *et al.*, 1997, Liu *et al.*, 1998, Linzmeier *et al.*, 1999). El gen de H β D-3 contiene dos exones localizados 13 kb río arriba del gen H β D-2, el primer exón incluye la región 5' no traducida del gen, el cual codifica un dominio de la pre-proteína y el segundo exón codifica el péptido maduro, que contiene los 6 residuos de cisteína (Dhople *et al.*, 2006). Entre las β -defensinas humanas identificadas, la H β D-3 genera gran interés, ya que la secuencia del péptido maduro de H β D-3 contiene seis aminoácidos, cargados positivamente, más que H β D-1 o H β D-2 (Jia *et al.*, 2001), lo cual determinaría su mayor acción bactericida en comparación a las otras β -defensinas, constituyendo una ventaja biológica con respecto éstas (Schibli *et al.*, 2002, Wu *et al.*, 2003).

La concentración salival de H β D-3 puede ser regulada por catepsinas, que son proteasas que cortan la proteína en los residuos de tipo cisteína, las cuales tienen la capacidad de degradar e inactivar la H β D-3, por lo tanto, las catepsinas juegan un papel importante en la regulación de la actividad del péptido, donde la sobre-expresión de éstas puede conducir a la degradación de las defensinas y con ello favorecer la infección bacteriana (Taggart *et al.*, 2003). Adicionalmente la actividad antibacteriana de H β D-3 y de otros péptidos antimicrobianos es inhibida

por una proteína de 31 kDa, la proteína inhibidora del complemento, secretada predominantemente por cepas M1 de estreptococos del grupo A, el cual sería un factor de virulencia que los protege de la acción bactericida de H β D-3 (Dhople *et al.*, 2006).

Estructura y función biológica

La H β D-3 es un péptido catiónico de 45 residuos, que posee 6 motivos de cisteína. Como se mencionó anteriormente la estructura terciaria de las β -defensinas consiste en tres hojas beta antiparalelas, unidas entre sí por tres enlaces disulfuro. (Dhople *et al.*, 2006).

La H β D-3, a diferencia de las otras defensinas, ha demostrado poseer un amplio espectro de actividad antibacteriana contra muchos patógenos y microorganismos resistentes a fármacos (Harder *et al.*, 2001, Hoover *et al.*, 2003, Wu *et al.*, 2003, Shelburne *et al.*, 2005, Starner *et al.*, 2005). Otros estudios han demostrado que H β D-3 también está implicada en otras funciones biológicas, tales como la quimio-atracción, conectando de esta manera la inmunidad innata y adaptativa (Wu *et al.*, 2003).

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). Se han postulado dos modelos por lo cual esto ocurre; el "modelo tipo carpeta", en el cual múltiples moléculas se sitúan sobre la superficie de la célula bacteriana y el otro posible modelo es el "modelo tipo poro", donde las moléculas forman poros en la

membrana causando la fuga o pérdida del contenido de la célula, en ambos casos el resultado final es la lisis bacteriana (Brogden, 2005).

La interacción de las defensinas con sus células blanco está dada por la atracción electrostática que se establece entre éstas, por su carga positiva y la membrana celular bacteriana, con componentes que le entregan una fuerte carga negativa, como el lipopolisacárido (LPS) en bacterias Gram -, el ácido lipoteicoico y peptidoglicanos en bacterias Gram + y los fosfolípidos propios de la membrana en el caso de ambas (Gomes and Fernandes, 2010).

Böhling *et al.*, el año 2006 plantearon que la interacción de H β D-3 con la membrana bacteriana es lípido específica, teniendo la habilidad de unir y neutralizar el LPS bacteriano, por interacción electrostática (Böhling *et al.*, 2006).

Además de la actividad antibacteriana, H β D-3 ha demostrado poseer propiedades inmuno-modulatorias, tales como la quimioatracción de linfocitos T y células dendríticas inmaduras, jugando un importante rol en la inmunidad adaptativa (Falk *et al.*, 1980), uniéndose y activando directamente al receptor CCR6, responsable de esta quimiotaxis (Wu *et al.*, 2003). La habilidad bactericida y de activación de componentes de la inmunidad de H β D-3 indican que esta molécula está involucrada en la inmunidad innata y en la inmunidad adaptativa así como otras defensinas (Yang *et al.*, 2004).

Estudios que correlacionan la estructura de H β D-3 y sus funciones, indican que la actividad antibacteriana depende de la carga positiva del péptido, adicionalmente un aumento de sus características hidrofóbicas potencia la

actividad bactericida en contra de bacterias Gram + y bacterias Gram – (Klüver *et al.*, 2005). Por otro lado, la presencia de enlaces disulfuros son indispensables para su función de quimiotaxis, ya que la ausencia de éstos mantiene sólo la actividad antibacteriana (Dhople *et al.*, 2006).

Función biológica a nivel oral

Las β -defensinas han demostrado expresión en tejido gingival, mucosa bucal, lengua, glándulas salivales y otras regiones de la cavidad oral (Mathews *et al.*, 1999, Krisanaprakornkit *et al.*, 1998, Zhao *et al.*, 1996). El patrón de localización de H β D-3 es principalmente en la capa basal del epitelio gingival (Lu *et al.*, 2005), lo cual podría reflejar el rol o función biológica de este péptido, que se basa en la facilitación de la interacción entre el epitelio gingival y el tejido conectivo subyacente, sirviendo como conexión entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Lu *et al.*, 2005).

Las β -defensinas poseen actividad contra patógenos orales que incluye *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Fusobacterium nucleatum*, así como *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*. Las β -defensinas funcionan como la primera línea de defensa en contra la colonización bacteriana en la cavidad bucal (Joly *et al.*, 2004, Song *et al.*, 2009, Feng *et al.*, 2005).

El biofilm oral al ser expuesto *in vitro* a la acción de H β D-3, resulta en un aumento del número de bacterias muertas, mayor que cuando se trata con clorhexidina o hidróxido de calcio (Lee *et al.*, 2013). El año 2012, se demostró *in vitro*, que la exposición de discos de hidroxiapatita a la acción de H β D-3,

disminuye el recuento total de bacterias en saliva, incluyendo a lactobacilos totales (Madhwani and McBain, 2012). Zhu *et al.* demostraron que H β D-3 no sólo inhibe la formación y maduración del biofilm, si no, que también es capaz de reducir el biofilm pre-existente en las superficies de implantes de titanio, inhibiendo la síntesis de polisacárido al nivel de transcripción de genes (Zhu *et al.*, 2013).

2.5 β -DEFENSINA HUMANA 3 Y CARIES.

A la fecha existen 3 estudios clínicos que buscaron una relación entre la incidencia de caries y la concentración salival de distintos péptidos antimicrobianos, los cuales presentaron resultados dispares (Tao *et al.*, 2005, Phattarataratip *et al.*, 2011, Ribeiro *et al.*, 2013). El objetivo de estos estudios clínicos fue determinar si estos péptidos podrían ser utilizados como método de diagnóstico del riesgo de caries y se fundamentan en la acción bactericida directa que éstos poseen sobre los patógenos orales, que corresponden a uno de los factores de riesgo de la instalación de la patología de caries, donde un diagnóstico temprano y oportuno permitiría la implementación de medidas preventivas para evitar la aparición de la enfermedad.

Tao *et al.*, realizaron un estudio donde participaron 149 niños entre 11 y 15 años, con y sin caries, se encontró que los niveles de H β D-3 y LL-37 no se correlacionaban con la experiencia de caries. Además, los niveles de H β D-3, mostraron una alta variación entre los sujetos, donde adicionalmente niños con caries no tenían altos niveles de *Streptococcus mutans* (Tao *et al.*, 2005).

Phattarataratip *et al.*, en un estudio en el que participaron 60 sujetos de 13 años, con y sin caries, demostraron que los niveles salivales de todos los péptidos antimicrobianos estudiados, α -defensinas 1, 2 y 3, β -defensinas 2 y 3, y LL-37, fueron altamente variables entre los sujetos y no se correlacionaban con la experiencia de caries. Se concluyó que las distintas combinaciones de estos péptidos aumentaron su actividad bactericida en contra de *S. mutans*, teniendo efecto sinérgico. Se observó además, mayor resistencia de *S. mutans* a la acción de los péptidos antimicrobianos, en el grupo de participantes con caries, lo cual podría ser un factor de virulencia de estos microorganismos, que les entrega una ventaja biológica, permitiendo la colonización bacteriana y la instalación de la patología (Phattarataratip *et al.*, 2011).

Ribeiro *et al.*, en un estudio que tuvo por objetivo determinar los distintos patrones de péptidos salivales en niños entre 10 a 71 meses, demostró que la H β D-3 se asocia a niños libres de caries, y este efecto podría estar potenciado por la presencia de la α defensina-3 (Ribeiro *et al.*, 2013).

En vista de los resultados dispares y difíciles de comparar, es necesario conocer en mayor profundidad cuál es la real relación de H β D-3 con el biofilm oral y si existe correlación como predictor del desarrollo de caries. Recientes investigaciones en el ámbito de la medicina indican que los biofilms juegan un importante rol en la salud, donde el conocimiento de las interacciones bacterianas aparece como el punto de partida para la prevención y control de las patologías orales (Twetman, 2012).

Con la comprensión de las interacciones microbianas en la cavidad oral, ha comenzado a existir un interés en la inhibición o modulación selectiva de los patógenos orales, modificando la composición bacteriana del biofilm oral. 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).

Al ser la caries una enfermedad con componente microbiológico, cobra sentido apelar a terapias preventivas inmunológicas para su control. Siguiendo esta lógica, existe la inmunización activa, es decir, la creación de anticuerpos anti *S. mutans* antes de la erupción dentaria, y la inmunización pasiva, o bacterioterapia mediante el uso de probióticos (Pereira *et al.*, 2010).

2.6 PROBIÓTICOS.

Los probióticos se definen como microorganismos vivos, principalmente bacterias, que son seguros para el consumo humano, y que ingeridos en cantidades suficientes, tienen efectos beneficiosos sobre la salud, más allá de la nutrición. Esta definición está aprobada por la Organización de Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas y por la Organización Mundial de la Salud. *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son los tipos de bacterias más comunes usadas como probióticos, incluyendo algunas levaduras y *Bacilli* (Meurman and Stamatova, 2007).

El uso de probióticos se basa en la implantación de una cepa no patógena en la microflora del hospedero para mantener o restaurar el microbioma natural

interfiriendo o inhibiendo a otros microorganismos, principalmente patógenos (Tvetman and Keller, 2012).

Los probables mecanismos de acción de los probióticos contra bacterias patógenas están descritos en la literatura, pero no están completamente dilucidados. Estos efectos son tanto a nivel local como sistémico, e incluyen exclusión competitiva a través de actividad antagónica sobre la adhesión y la nutrición, co-agregación e inhibición competitiva del crecimiento, producción de ácidos orgánicos y compuestos tipo bacteriocinas y la estimulación de la inmunidad natural y de la inmunidad adquirida tanto humoral como celular (Reid *et al.*, 2003, Erickson and Hubbard, 2000).

Las bacterias probióticas deben cumplir ciertas características o condiciones para ser consideradas como tal (Kumari *et al.*, 2011) :

1. Debe ser una cepa que sea capaz de ejercer un efecto beneficioso en el hospedero animal, por ejemplo aumentar la resistencia a enfermedades.
2. No debe ser tóxico ni patogénico.
3. Debe estar presente como célula viable, preferentemente en un gran número.
4. Debe ser capaz de sobrevivir y metabolizar o metabolizarse en el ambiente intestinal, por ejemplo debe resistir el pH bajo, la bilis, etc.
5. Debe ser estable bajo condiciones de almacenamiento.

2.6.a Origen y vehículos de distribución de probióticos.

Las bacterias probióticas son habitantes naturales de la flora intestinal y la mayoría de las cepas y las especies son aisladas de humanos sanos, aunque

existen algunos que se originan de la comida fermentada. Los probióticos son administrados en los alimentos en una de las siguientes posibilidades (Caglar *et al.*, 2005).

- Como cultivo concentrado adicionado a bebidas, por ejemplo jugo de fruta.
- Inoculado en fibras prebióticas, las cuales promueven el crecimiento de bacterias probióticas.
- Inoculado en leche o alimentos derivados de la leche, por ejemplo queso o yogurt.
- Como liofilizado, células secas envasadas como suplementos dietéticos o dietarios, por ejemplo tabletas, gomas de mascar, etc.

El alimento típico que contiene bacterias probióticas es el yogurt y su consumo diario parece ser la forma más natural de ingerir el probiótico (Caglar *et al.*, 2005). Otra ventaja de los productos que contienen leche, es que además poseen nutrientes básicos para el correcto crecimiento de los niños (Petti *et al.*, 2008). Se recomienda una ingesta diaria de 150-200 mL con una formulación aproximada de 10^8 bacterias probióticas por gramo o mililitro de vehículo (Cabana *et al.*, 2006).

Las primeras especies introducidas en la investigación de los probióticos fueron *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*, estudios demostraron que poseen beneficios a la salud tales como la reducción de la susceptibilidad a infecciones y las alergias, alivian la intolerancia a la lactosa, regulan la presión

sanguínea y los valores de colesterol (Meurman, 2005). A nivel oral los más estudiados han sido *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. y *Saccharomyces boulardii* (Sazawal *et al.*, 2006, He *et al.*, 2009).

2.6.b Aplicación de los probióticos a la salud oral.

Distintas revisiones de la literatura reportaron el uso de probióticos para la prevención de enfermedades orales, incluyendo la caries. Existen varias revisiones sobre el efecto de los probióticos en la microbiota oral y como éstos influyen en las distintas patologías bucales (Bonifait *et al.*, 2009, Stamatova and Meurman, 2009, Meurman and Stamatova, 2007, Twetman and Keller, 2012, Twetman, 2012, Saha *et al.*, 2012, Cagetti *et al.*, 2013, Flichy-Fernández *et al.*, 2010, Yanine *et al.*, 2013).

Los probióticos son administrados para mantener o restaurar la microflora en contra de la invasión patógena, la cual es el punto de partida de la mayoría de las enfermedades orales (Saha *et al.*, 2012). Existen condiciones deseables que deben poseer los probióticos para ser usados en la prevención de patologías bucales, las cuales se relacionan con su capacidad de adherencia y colonización en las distintas superficies de la cavidad bucal. Sin embargo, existe suficiente evidencia que respalda el hecho de que los probióticos no colonizan la cavidad oral en forma permanente. Diversos estudios que comprenden análisis de heces, placa dental y saliva han reportado que la recolección de bacterias probióticas ingeridas se puede obtener como máximo, hasta una semana después de terminada la ingesta del alimento o suplemento (Yli-Knuuttila *et al.*, 2006, Caglar *et al.*, 2008). Es por esto, que todos los ensayos clínicos que han investigado el uso

de probióticos en salud oral, se basan en las ingestas diarias regulares, o al menos de 4 a 5 veces por semana, sugiriendo que su efecto se consigue en la medida en que éste tenga presencia en el medio ambiente oral (Twetman and Keller, 2012).

Las principales cepas aisladas para obtener beneficios a nivel gastrointestinal han sido adoptadas y estudiadas para verificar su efecto a nivel de la cavidad oral, buscando distintos beneficios, como la reducción de incidencia de caries, modificaciones en el recuento de mutans streptococci y otros microorganismos cariogénicos, así como también el control del pH de la placa. Entre las cepas estudiadas se encuentran *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LB21, *L. reuteri*, *L. paracasei*, *L. brevis* CD2, *Bifidobacterium* spp., entre otras (Cagetti *et al.*, 2013). Los *Lactobacilli* son considerados como bacterias cariogénicas, ya que son capaces de producir ácidos producto de la fermentación de azúcares, pero estudios clínicos e *in vitro* apoyan la idea de sus efectos beneficiosos en la salud oral, donde el consumo de esta cepa como probiótico no ha demostrado el aumento de la incidencia de lesiones de caries (Badet and Thebaud, 2008).

Los probióticos han sido estudiados *in vitro* en contra de miembros específicos de la microbiota oral, a menudo *Streptococcus mutans* (Simark-Mattsson *et al.*, 2007), debido al papel central reportado para estos microorganismos en la caries dental (Tanzer *et al.*, 2001, He *et al.*, 2009). Estos estudios investigaron las propiedades bioquímicas de los probióticos y su interacción con las bacterias orales en modelos de biofilm. Se evaluó la actividad metabólica de distintas cepas (Hedberg *et al.*, 2008), la co-agregación con

bacterias cariogénicas (Twetman *et al.*, 2009), la inhibición del crecimiento de mutans streptococci (Keller *et al.*, 2011), la producción de bacteriocinas (Teughels *et al.*, 2008) y el efecto inhibitorio en la formación de biofilm (Söderling *et al.*, 2011), estos resultados validan colectivamente el rol potencial de los probióticos en modular la ecología oral (Twetman and Keller, 2012).

Se han realizado estudios clínicos cuyo objetivo fue evaluar el efecto de la administración de probióticos sobre el recuento de *S. mutans*, Nikawa *et al.* (Nikawa *et al.*, 2004), demostraron que el consumo de yogurt que contiene *Lactobacillus reuteri* sobre un período de dos semanas reduce la concentración de *S. mutans* en la saliva hasta un 80%. Resultados comparables fueron obtenidos incorporando probióticos en la goma de mascar (Caglar *et al.*, 2007), en el queso (Ahola *et al.*, 2002) y en cápsulas masticables (Campus *et al.*, 2014, Caglar *et al.*, 2006). En estos estudios el vehículo de administración del probiótico parece ser secundario, ya que los resultados han sido similares cuando el vehículo es un derivado lácteo, y cuando el consumo es en tabletas y goma de mascar. En estos estudios no se reportaron efectos adversos o riesgos potenciales a la salud mientras duró la intervención (Twetman and Keller, 2012).

A la fecha, existen 5 estudios clínicos que tienen como objetivo buscar una relación entre el consumo de probióticos y la incidencia de caries en niños (Näse *et al.*, 2001, Stecksén-Blicks *et al.*, 2009, Taipale *et al.*, 2013, Hasslöf *et al.*, 2013, Stensson *et al.*, 2014). Näse *et al.* (Näse *et al.*, 2001), evaluaron el efecto del consumo de leche suplementada con la cepa de *L. rhamnosus* GG. Los autores concluyeron que los niños que consumen leche con probióticos, particularmente

aquellos de 3- 4 años de edad, tienen significativamente menos caries dentales y menor contenido de *S. mutans* en la saliva que aquellos niños que consumieron leche sin probióticos. Por otra parte, Stecksén-Blicks *et al.*, afirmaron que los probióticos reducen la incidencia de caries, de manera estadísticamente significativa, en niños pre-escolares luego del consumo diario de leche durante 21 meses, suplementada con *L.rhamnosus* LB21 y 2.5 mg de flúor (Stecksén-Blicks *et al.*, 2009). En este estudio se hace difícil separar el efecto protector de caries del probiótico del efecto preventivo que posee la aplicación de flúor. Taipale *et al.*, no encontraron diferencias en la ocurrencia de caries (de esmalte o dentina franca) según criterios ICDAS en niños de 4 años de edad, posterior al consumo de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, en comparación a los grupos control que consumieron xilitol y sorbitol. Además en el grupo probiótico, los niños que consumieron la cepa no presentaron mayor o menor incidencia de caries, que aquellos niños del mismo grupo que no consumieron el probiótico, entonces en una población con baja incidencia de caries, el consumo de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 no influyó en la incidencia de caries en niños de 4 años de edad (Taipale *et al.*, 2013). Lo mismo fue reportado por Hasslöf *et al.*, quienes no encontraron relación entre el consumo de cereal suplementado con *Lactobacillus paracasei* F19, entre los 4 a 13 meses de vida, y la presencia de caries a los 9 años (Hasslöf *et al.*, 2013). Sin embargo, Stensson *et al.*, usando una cepa probiótica distinta, *Lactobacillus reuteri*, administrada a madres embarazadas y al hijo durante el primer año de vida, obtuvieron como resultado la disminución de la prevalencia de caries y gingivitis a los 9 años de edad, en

comparación al grupo donde los niños y sus madres no consumieron el probiótico (Stensson *et al.*, 2014).

La evidencia presentada en relación al uso de cepas probióticas para la prevención de la caries, ha mostrado resultados prometedores, aunque sólo unos pocos estudios han expuesto resultados clínicos claros. Se ha documentado que los probióticos no poseen efectos negativos a nivel de la salud oral, la tendencia es a la disminución de la incidencia de caries, pero la comparación directa de resultados clínicos se dificulta por la disparidad de metodologías, en cuanto a la cepa usada, la concentración, el vehículo de administración y el tiempo de duración de la intervención. La evidencia científica es aún pobre, y a la fecha no existen estudios clínicos que permitan conocer cuál es el efecto de consumo de éste en la modulación del sistema inmune oral, y como esto afectaría al biofilm (Cagetti *et al.*, 2013).

Se ha descrito a nivel intestinal que cepas probióticas son capaces de estimular la producción de defensinas, principalmente la H β D-2, la cual al igual que la H β D-3, posee una expresión inducible (Harder *et al.*, 2001), donde esta expresión tiene como consecuencia la disminución de los cuadros de diarrea aguda, en adultos mayores de 65 años (Wehkamp *et al.*, 2004, Schlee *et al.*, 2007, Moro-García *et al.*, 2013). A diferencia de lo que ocurre a nivel intestinal, a nivel oral no existe evidencia que relacione el uso de probióticos con la producción de defensinas, no se conoce si existe una relación entre su consumo y la concentración de H β D-3 en la saliva, y si es a través de la estimulación en la producción de estos péptidos que es capaz de disminuir la incidencia de caries.

Adicionalmente los estudios que relacionan la expresión de H β D-3 con caries son escasos y presentan resultados dispares (Ribeiro *et al.*, 2013, Tao *et al.*, 2005, Phattarataratip *et al.*, 2011), en vista de lo anterior, es necesario establecer si el consumo regular de probióticos incide en la concentración de este péptido, como lo hacen a nivel intestinal con la H β D-2 estimulando su síntesis, lo que nos va permitir aportar evidencia al conocimiento del mecanismo de acción de los probióticos y el efecto que poseen sobre la inmunidad innata a nivel oral.

3. HIPÓTESIS.

Los niños pre-escolares de 2 a 3 años pertenecientes a Jardines infantiles Integra del Área Norponiente de la Región Metropolitana, que consumen leche enriquecida con *Lactobacillus rhamnosus* SP1 (Sacco, S.R.L, Italia) durante 14 meses, presentan una mayor concentración salival de Beta Defensina humana 3, que aquellos que consumen leche sin probióticos.

4. OBJETIVO GENERAL.

Establecer si los niños pre-escolares que consumen leche enriquecida con *Lactobacillus rhamnosus* SP1 (Sacco, S.R.L, Italia) durante 14 meses, presentan una mayor concentración salival de Beta Defensina Humana 3, que aquellos que consumen leche sin probióticos.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinar la concentración salival de Beta Defensina Humana 3, al inicio y a los 14 meses del estudio, en el grupo experimental o suplementado con probiótico.
2. Determinar la concentración salival de Beta Defensina Humana 3, al inicio y a los 14 meses del estudio, en el grupo control o placebo.
3. Comparar la expresión de Beta Defensina Humana 3 al inicio y a los 14 meses del estudio entre el grupo control y el grupo experimental.

6. METODOLOGÍA.

6.1 Diseño.

Ensayo clínico controlado randomizado por conglomerados, triple ciego. Estudio prospectivo.

Se realizó la randomización por conglomerados aleatorizando por jardín infantil, de manera que la totalidad de alumnos del jardín consumió la bebida experimental, leche enriquecida con *Lactobacillus rhamnosus* SP1 (Sacco, S.R.L, Italia), o bien, la bebida placebo, que corresponde a la misma leche, pero sin la cepa probiótica, minimizando la posibilidad de equivocaciones entre individuos. Los diferentes jardines infantiles Integra Área Norponiente de la Región Metropolitana, fueron asignados de manera aleatoria a los grupos de intervención o 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. En la tabla N°1 se presentan las variables estudiadas.

Esta tesis se encuentra inserta en el Proyecto FONIS “Efecto del consumo de leche enriquecida con probióticos lactobacilos en la reducción de incidencia de lesiones de caries en niños pre-escolares” FOLIO N° SA11I2035, y fue financiado por el Fondo Nacional para Investigación en Salud y por el proyecto FONDECYT 1130570.

Tabla N°I. Variables estudiadas

Nombre de la variable	Definición conceptual	Definición operacional	Naturaleza
Consumo de probiótico	El consumo de 150 mL de leche parcialmente descremada con/sin 10^7 UFC/G de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> SP1.	Pertenece al Grupo Experimental o a Grupo Control.	Nominal
Género	Masculino o Femenino.	Información de género registrada en establecimiento educacional	Nominal
Concentración salival de Beta Defensina Humana 3	Concentración de Beta Defensina Humana 3 en saliva de pre-escolares pertenecientes al grupo experimental o control.	Diferencia de los niveles de Beta Defensina Humana 3 por mL de saliva no estimulada, comprendido entre el examen basal y el realizado a los 14 meses de iniciada la intervención.	Continua

6.2 Aspectos éticos.

Este proyecto se rige por los principios de la declaración de Helsinki, se encuentra dentro del marco legal que regula los ensayos clínicos en Chile y cuenta con la aprobación del comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (ACTA N° 2011/13), (Anexo N°1). Se solicitó la firma de un documento de consentimiento informado a los padres y apoderados de los jardines seleccionados, de manera que se les permitió participar a los pre-escolares de manera voluntaria e informada. Destacando el carácter de confidencial de los resultados obtenidos, (Anexo N°2).

Aquellos individuos diagnosticados con caries cavitadas antes del inicio de la intervención y que precisen tratamiento restaurador, fueron derivados a atención

clínica a la red de salud correspondiente. A los jardines infantiles donde se realizó la intervención se les benefició con la entrega de una pasta de dientes a cada participante, una vez concluido el proyecto.

6.3 Muestra.

Población objetivo: Pre-escolares de 2 a 3 años, género femenino y masculino, que asisten a establecimientos educacionales pertenecientes a la fundación Integra del Área Norponiente de la Región Metropolitana.

Muestra: En este estudio clínico el tamaño de la muestra se determinó por conveniencia, el universo a partir del cual se seleccionó la muestra son los participantes del estudio FONIS SA11I2035, en el cual participaron un total de 240 pre-escolares. Se confeccionó la muestra de tal forma que existió un balance de prevalencia de caries de 30% para ambos grupos, los datos de índices de caries se encontraban en la ficha de cada participante ya que fueron calculados para el estudio FONIS. El examen clínico para determinar los índices de caries fue realizado por 2 equipos de odontólogos clínicos con experiencia, capacitados y previamente calibrados (intra e inter examinador) en la detección de lesiones caries, quienes examinaron a los niños/as en las salas de clases de los jardines infantiles correspondientes y registraron la historia de caries de acuerdo a los códigos 5 y 6 del criterio ICDAS II (Shivakumar *et al.*, 2009). El método de detección de caries ICDAS (International Caries Detection and Assessment System), desarrollado el año 2002, y posteriormente revisado en 2005 (ICDAS II) (Ismail *et al.*, 2007), es un método simplificado diseñado para detectar seis diferentes estados del proceso de caries. El sistema abarca la detección de

cambios tempranos clínicamente visibles en esmalte hasta cavidades extensas en dentina. Las lesiones de caries se clasifican de acuerdo a su severidad a través de códigos que van desde el 0 al 6 (Tabla N° II). Estos códigos deben ser aplicados por sección y superficie; en la corona: mesial/distal, fosas y fisuras y vestibular/palatino; en la raíz; y en caries asociadas a restauraciones o sellantes. El sistema se encuentra validado y presenta un protocolo de calibración intra e inter examinador (Ismail *et al.*, 2007, Shivakumar *et al.*, 2009).

Tabla N°II: Criterios de detección ICDAS

Código	Descripción
0	Superficie sana
1	Primeros cambios visuales en esmalte
2	Cambios visuales distinguibles en esmalte
3	Ruptura localizada de esmalte (sin dentina visible)
4	Sombra en dentina (con o sin ruptura de esmalte)
5	Cavidad distinguible con dentina visible
6	Cavidad extensa distinguible con dentina visible

Para tales efectos, se utilizó una linterna con luz artificial LED, instrumental de examen esterilizado (espejo, sonda CPITN de la OMS), gasa, guantes desechables, mascarilla, alcohol-gel.

La calibración previa al estudio contó con sesiones teóricas (evaluación del protocolo del estudio, criterios de detección, cómo llenar ficha clínica), sesiones prácticas (examen de 6 individuos de 2 años de un jardín Integra seleccionado de manera rotativa entre dos equipos de examinadores, errores de registro en ficha y se homogenizarán criterios) y ejercicio real de calibración (se examinaron 20 individuos de 2 años elegidos aleatoriamente de un Jardín Integra seleccionado, realizado dos veces en dos días diferentes y sin comunicación entre

examinadores). Se aceptó un índice de concordancia Kappa de 0,7 como mínimo. La calibración previa se realizó dos semanas antes del comienzo del estudio.

Se registró el índice ceod individual de cada participante (ICDAS II códigos 5 y 6), a partir de este dato se calculó la prevalencia de caries según la OMS, donde 0 es libre de caries y 1 es con caries.

La confección de la muestra fue estratificada por sexo y por prevalencia de caries, con el objetivo de lograr comparabilidad entre grupos. El cálculo del tamaño muestral se realizó con el software GRANMO, para un nivel de confianza de 0,05 y un poder estadístico del 80%, donde cada grupo, control y experimental, tenían 21 niños.

Criterios de Inclusión: Los criterios de inclusión correspondieron a niños y niñas sanos con o sin lesiones de caries cavitadas al inicio del estudio, que no presentan intolerancia a las bebidas lácteas o alergia a alguno de los componentes de las bebidas experimentales y/o placebo.

6.4 Intervención.

Los niños asignados al grupo experimental recibieron 150 mL de leche en polvo parcialmente descremada al 12% (Macro Food S.A, Santiago, Chile), con 10^7 UFC/mL de *Lactobacillus rhamnosus* SP1, cepa que es genéticamente idéntica a *L. rhamnosus* GG (Anexo N°3), que fue preparada mediante un proceso de reconstitución con agua tibia.

La leche experimental y la leche control fueron consumidas en las tardes, durante la jornada escolar, exclusivamente durante los 5 días de la semana y no durante los fines de semana, feriados o periodos de vacaciones. Los niños del

grupo control recibieron 150 mL de leche en polvo parcialmente descremada al 12% (Macro Food S.A, Santiago, Chile), sin el probiótico antes descrito, producto que fue preparado de la misma manera que la leche experimental.

Preparación de la leche

Se realizó una capacitación a las manipuladoras de alimentos de cada jardín infantil para la correcta preparación de la leche según las instrucciones indicadas por el fabricante. Se debió hervir 5 litros de agua, luego se bajó la temperatura usando un batidor hasta los 50°C, en este momento se agregó la leche en polvo (envase de 500 g), se agitó hasta lograr 40°C, donde las temperaturas fueron registradas con termómetros, que se entregaron por los investigadores. Posteriormente se incorporó un sobre contenido en el mismo envase, que en el caso del grupo experimental contiene el probiótico, y en el caso del grupo control contiene leche. Ambos productos tienen las mismas características organolépticas para evitar el sesgo de selección. La leche fue adquirida por el grupo investigador y entregada a los jardines infantiles regularmente, monitoreando la oportuna distribución y el adecuado almacenamiento.

Se realizó el monitoreo de reacciones adversas por parte de un médico general que entregó información y tratamiento en caso de ser necesario.

6.5 Toma de muestras, determinación de H β D-3 e índices de caries.

Toma de muestra salival

La recolección de muestras de saliva se realizó al inicio y a los 14 meses del estudio durante el transcurso de la mañana en el jardín infantil

correspondiente. El procedimiento se realizó en cada sesión bajo las mismas condiciones y por el mismo operador, se tomaron muestras de saliva no estimulada según describe Näse *et al.* (Näse *et al.*, 2001). Mediante una pipeta estéril, se recolectaron 1,5 mL de saliva y se depositó en un tubo plástico estéril. Las muestras fueron trasladadas refrigeradas (4°C) al Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, para posteriormente ser almacenadas a -80°C previo al análisis bioquímico. Al momento del análisis las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente.

Determinación de H β D-3

Los niveles de H β D-3 en las muestras de saliva fueron determinados usando un ensayo de unión enzimático de inmuno absorbanza (ELISA) (US Biological ®, USA), según las indicaciones del fabricante. En breve, muestras de saliva sin diluir fueron incubadas en placas de microtitulación de 96 pocillos sensibilizadas con el anticuerpo monoclonal anti H β D-3 durante 1 hora a 37°C. Posteriormente la placa fue lavada 4 veces con una solución de PBS tween (PBS-T) al 0,05% (PBS: la solución de PBS está compuesta por NaCl 137mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM), y bloqueada con albúmina sérica bovina al 1%, durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se lavó 4 veces con PBS-T y se incubó con anticuerpo monoclonal biotinilado anti H β D-3, por 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavar la placa 4 veces con PBS-T, se incubó con estreptavidina-HR por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la placa se lavó 5 veces con PBS-T y se incubó por 10 minutos en el sustrato cromogénico, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina o TMB, y la reacción se detuvo utilizando H₂SO₄ al 1%. Dentro de los 30 minutos siguientes de detenida la

reacción, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 450 nm y los valores de absorbancia fueron interpolados en la curva estándar para H β D-3 recombinante, para determinar la concentración de cada muestra la cual fue expresada en pg/mL.

Índices de caries

Como se explicó en la selección de la muestra, los participantes de este estudio fueron seleccionados por conveniencia del proyecto FONIS SA11I2035. Los índices de caries, ceod y prevalencia OMS, fueron analizados para aportar mayor información y poder hacer comparaciones con trabajos anteriores.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos fueron codificados e ingresados a una base de datos por un sólo operador en archivo Excel Office para Windows. Luego se traspasaron al programa STATA versión 11 para ser sometidos a análisis estadístico. Se desarrolló un análisis descriptivo de los datos. Se calculó la diferencia de los niveles de H β D-3 tomando los niveles en tiempo inicial y final para cada grupo.

Además se tomaron los índices de caries y se relacionaron con las concentraciones respectivas de H β D-3 en saliva, para determinar si existía relación entre la concentración de este péptido y la presencia de lesiones cavitadas. En este caso sólo se utilizaron los índices que estaban registrados para cada niño al inicio del estudio, ya que los datos al término del estudio no estaban completos, hubo sujetos que el día que se hizo el examen clínico no se encontraban en el establecimiento. Para las variables cuantitativas se presentaron valores con intervalo de confianza de un 95%. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas si el valor del p-value obtenido en el test es igual o menor a 0,05.

8. RESULTADOS.

8.1 Caracterización de la población en estudio.

Las características demográficas de los pre-escolares que participaron en el estudio, se encuentran separadas por grupo, control o que no consumió la leche suplementada con probióticos y experimental que consumió la leche suplementada con probióticos. La edad se expresa como el promedio por grupo y se incluye la desviación estándar. Además los grupos se encuentran balanceados en sexo y en el N. Se seleccionaron 42 niños en total, 21 para cada grupo, con 11 mujeres y 10 hombres cada uno (tabla N°III). Durante los 14 meses que duró la intervención no existieron reacciones adversas al consumo diario de la leche enriquecida con el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1.

Tabla N°III: Características demográficas de la población en estudio.

	Grupo sin probiótico	Grupo con probiótico
Edad	2,95 +/- 0,34	2,92 +/- 0,28
Sexo	11 femenino 10 masculino	11 femenino 10 masculino
N	21	21

8.2 Índices de caries al inicio del estudio.

El ceod se expresa en la tabla como el promedio con su respectiva desviación estándar, donde no existen diferencias significativas entre ambos grupos, al aplicar el test de Mann-Whitney ($p > 0,05$). La prevalencia OMS está expresada como el porcentaje de individuos sanos que posee cada grupo al inicio del estudio, donde no existen diferencias significativas, aplicando el test de Fisher ($p > 0,05$) entre el grupo que consumió el probiótico y el grupo que consumió el

placebo. Entonces ambos grupos se encuentran balanceados en sexo, edad, e índices de caries (tabla N°IV).

Tabla N°IV: Índices de caries al inicio del estudio.

	Grupo sin probiótico	Grupo con probiótico
ceod	0,85 +/- 1,52	0,80 +/- 1,60
Prevalencia OMS	66,6%	71,43%

8.3 Concentración salival de H β D-3 al inicio del estudio y prevalencia de caries OMS.

La media de la concentración salival de H β D-3 al inicio del estudio para el grupo sin caries (prevalencia 0) fue de 356,66 pg/mL y en el grupo con caries (prevalencia 1) fue de 773,82 pg/mL, como se observa en la figura N°1. En este caso los grupos fueron divididos por la prevalencia y no por su condición de experimental o control, ya que este análisis se hizo antes del consumo del probiótico.

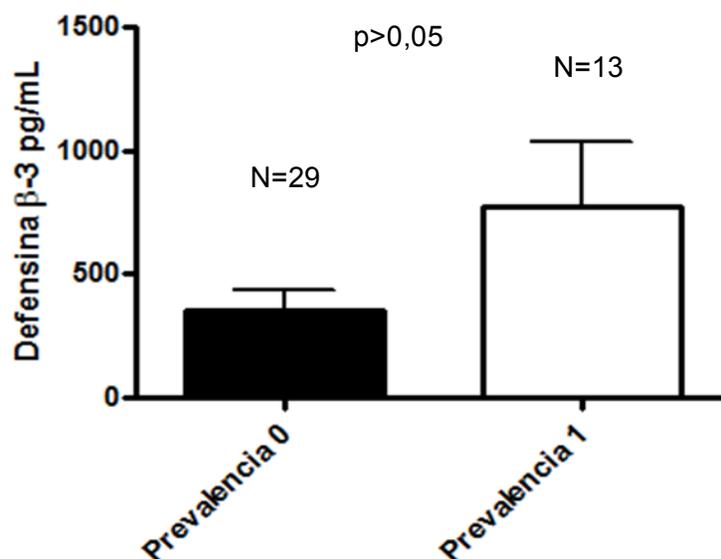


Figura N°1: Concentración salival de H β D-3 en pg/mL y prevalencia de caries OMS. Las barras representan la media y desviación estándar de la concentración salival de H β D-3. Sobre cada barra se encuentra la cantidad de niños en cada grupo. Mann-Whitney test $p > 0,05$.

8.4 Concentración salival de H β D-3 v/s ceod al inicio del estudio.

La concentración salival de H β D-3 al inicio del estudio según la severidad de caries fue calculada con el índice ceod de cada niño. Para esto fueron divididos los participantes en tres grupos; ceod igual a 0, ceod entre 1-2 y ceod mayor o igual a 3. La media para el grupo ceod 0 fue de 356,66 pg/mL, para el grupo ceod 1-2 fue de 319,18 pg/mL y para el grupo ceod mayor o igual a 3 fue de 1304,22, valores representados en la figura N°2. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el grupo ceod igual a 0 y el grupo ceod mayor o igual a 3, es decir, a mayor severidad de caries hay mayor producción de H β D-3. A pesar de que en el grupo ceod entre 1-2 se observa muy similar al grupo ceod igual a 0, no existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración del péptido en saliva con el grupo ceod mayor o igual a 3. Tampoco se observaron diferencias en la concentración entre no tener caries y tener 1 ó 2.

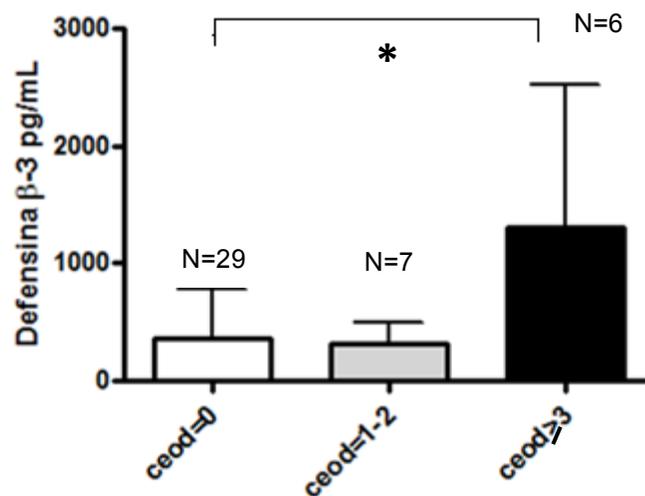


Figura N°2: Concentración salival de H β D-3 en pg/mL y severidad de caries. Las barras representan la media y desviación estándar de la concentración salival de H β D-3. Sobre cada barra se encuentra la cantidad de sujetos pertenecientes a cada grupo. Kruskal-Wallis test $p < 0,05$.

8.5 Concentración salival de H β D-3 en saliva.

En el grupo que consumió el probiótico, la concentración salival de H β D-3, disminuyó de 597,91 pg/mL a 126,29 pg/mL ($p < 0,05$). En el grupo que no consumió el probiótico la concentración salival no presentó diferencia estadísticamente significativa entre ambos tiempos de medición ($p > 0,05$). Nótese la gran variabilidad de las concentraciones al inicio de la intervención en ambos grupos y como esta disminuye una vez que se consume el probiótico en el grupo experimental.

Está tabulada la concentración de la defensina, su media y desviación estándar, al inicio (tiempo= 0) y a los 14 meses (tiempo= 1) de completada la intervención en ambos grupos. Mediante la prueba de Shapiro Wilk se descartó la normalidad de los datos y se aplicó el test no paramétrico de Wilcoxon (tabla N°V).

Tabla N°V: Concentración salival de H β D-3 en pg/mL.

	Grupo sin probiótico	Grupo con probiótico
Tiempo 0	373,49 +- 541,82	597,91 +- 743,28
Tiempo 1	370 +- 468,97	126,29 +- 69,3 *

La figura N°3, representa las concentraciones salivales de H β D-3, al inicio, tiempo =0 y al término de la intervención, tiempo =1, de los dos grupos, con consumo de probióticos y sin consumo de probióticos. Se observa que el grupo con probióticos presenta una amplia variabilidad de las concentraciones, con una gran desviación estándar antes de empezar la intervención (t=0), que una vez que consume el probiótico (t=1), disminuye no sólo la concentración en saliva del péptido, si no que además disminuye la desviación estándar. En el grupo que no

consume el probiótico esta variabilidad se mantiene a lo largo del tiempo, así como también los altos valores de su desviación estándar.

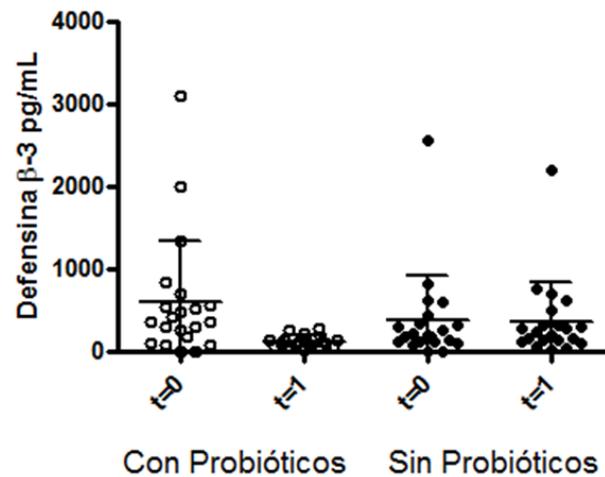


Figura N°3: Variabilidad de la concentración salival de HβD-3 al inicio (t=0) y a los 14 meses (t=1). Los puntos expresan las concentraciones individuales de cada niño, se observan las medias y sus desviaciones estándar, en cada grupo.

Al analizar la concentración de HβD-3 en saliva no estimulada en ambos grupos, se observó que en el grupo que no consume el probiótico, la concentración de la defensina no se modifica una vez transcurrido los 14 meses, a diferencia de lo que ocurre en el grupo que consumió la leche suplementada con el probiótico, donde se observa una disminución entre el inicio y el término del consumo (Figura N°4) ($p < 0,05$), test de Wilcoxon.

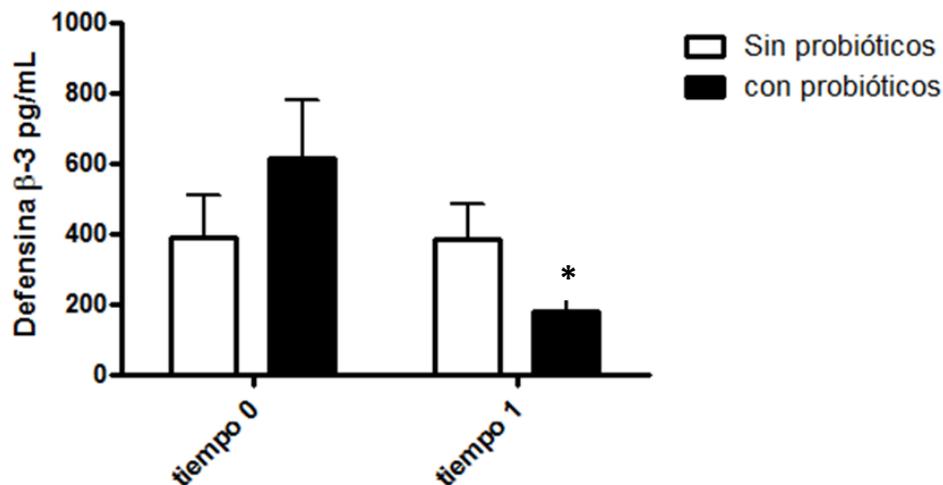


Figura N° 4: Concentración salival de HβD-3 en pg/mL. Las barras representan la media y la desviación estándar de la concentración salival de HβD-3 en cada grupo, con probiótico y sin probiótico, al inicio (tiempo 0) y al término del estudio (tiempo 1).

Se calculó la diferencia en los niveles salivales de HβD-3, entre el inicio del estudio y el término de éste, para ambos grupos. Para esto se tomó la diferencia individual de cada niño, es decir, la concentración salival de HβD-3 a los 14 meses, menos la concentración al inicio del estudio y son esos deltas individuales los que se utilizaron para el cálculo de los promedios en cada grupo con su respectiva desviación estándar. La disminución en el grupo que consumió la leche suplementada con el probiótico es estadísticamente significativa ($p < 0,05$) y en el grupo control los valores no se modifican luego de transcurridos los 14 meses (tabla N°VI), Mann-Whitney test.

Tabla N°VI: Cambio en la concentración salival de HβD-3.

Cambio entre el inicio y los 14 meses	
Grupo sin probiótico	-3,643 +/- 222,9
Grupo con probiótico	-471,6 +/- 745,5 *

El grupo que no consume probióticos no presenta modificación en la concentración salival de la proteína, en cambio el grupo que consumió el probiótico tiene una disminución estadísticamente significativa con un $p < 0,05$. En la figura N°5, se representa el cambio o delta que se produce en la concentración salival de H β D-3, en ambos grupos luego de transcurridos los 14 meses.

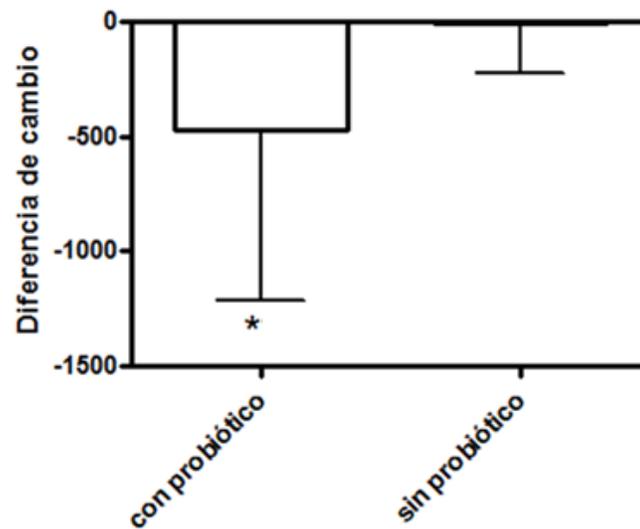


Figura N°5: Cambio en la concentración salival de H β D-3 después de 14 meses. Las barras representan la media y desviación estándar del cambio en la concentración salival de H β D-3, entre el inicio y término del estudio. Mann-Whitney test $p < 0,05$.

9. DISCUSIÓN

En la cavidad oral la superficie epitelial, es regularmente colonizada por diferentes microorganismos, pero no necesariamente es infectada por éstos. La barrera epitelial, así como componentes del sistema inmune adaptativo y los péptidos antimicrobianos, como parte del sistema inmune innato, son los responsables de la mantención de este balance ecológico (Dale and Krisanaprakornkit, 2001, Ganz, 2003). La función de la barrera epitelial es particularmente relevante en la cavidad oral ya que corresponde a un elemento donde convergen múltiples elementos inmunológicos que previenen la invasión de organismos patógenos, además es la única área del cuerpo donde tejidos duros atraviesan esta barrera, lo cual implica que los tejidos periodontales que rodean al diente adquieren una especialización que los lleva a formar una unión efectiva alrededor de las estructuras dentarias. Esta adaptación anatómica única es lo que los lleva a establecer una cierta vulnerabilidad de su tejido, la cual se hace particularmente relevante dado la continua exposición al biofilm (Gomes and Fernandes, 2010).

La respuesta inmune, particularmente los mecanismos de la inmunidad innata, son esenciales para la mantención del balance temprano entre la salud y la enfermedad (Gomes and Fernandes, 2010). Dentro de los mecanismos de la inmunidad innata están las β -defensinas, las cuales han sido ampliamente identificadas en los distintos tejidos de la cavidad oral (Dunsche *et al.*, 2002). La H β D-3 que posee una potente acción bactericida sobre un amplio espectro de bacterias (Gram + y Gram -), virus y hongos, este péptido al igual que H β D-2, es

sintetizado, por las células epiteliales, en presencia de bacterias y de mediadores inflamatorios como TNF- α (Harder *et al.*, 2001, Liu *et al.*, 1998). La acción bactericida de H β D-3, ha sido demostrada *in vitro*, modulando las especies presentes en el biofilm oral (Ouhara *et al.*, 2005, Maisetta *et al.*, 2005, Maisetta *et al.*, 2003, Song *et al.*, 2009, Madhwani and McBain, 2012, Lee *et al.*, 2013, Zhu *et al.*, 2013).

Por otra parte, existe la posibilidad de producir modificaciones a nivel del biofilm oral por la acción de bacterias probióticas, las cuales han demostrado tanto *in vitro* como en estudios clínicos, producir la inhibición de especies bacterianas, responsables de la instalación de patologías de alta prevalencia, como lo es la caries dental (Cagetti *et al.*, 2013). Hasta ahora no existe evidencia suficientemente clara de cual es el mecanismo de acción a nivel oral de los probióticos, ni como podrían influenciar al sistema inmune innato.

Al igual que en todos los estudios donde existe consumo de probióticos en niños (Cagetti *et al.*, 2013), en nuestro estudio no se reportaron reacciones adversas al consumo de lactobacilos, por lo tanto, la cepa *Lactobacillus rhamnosus* SP1, se podría definir como una cepa segura para el consumo en niños pre-escolares.

Estudios previos han identificado los distintos péptidos en saliva, estimulada y no estimulada, en niños (Tao *et al.*, 2005, Phattarataratip *et al.*, 2011, Ribeiro *et al.*, 2013). La concentración de H β D-3 en saliva no estimulada, observada al inicio de la intervención, es altamente variable entre los individuos, al igual que los resultados reportados por Tao y Phattarataratip, donde las concentraciones de H β D-3 en saliva, estimulada y no estimulada, en niños tiene una alta variabilidad

en los sujetos de estudio, este fenómeno se podría atribuir a la organización de los genes de la proteína, ya que los genes de las β -defensinas se encuentran en un cluster del cromosoma 8, donde éstos poseen múltiples copias repetidas de ellos (Hollox *et al.*, 2003). Tao *et al.*, plantean que la presencia de múltiples copias de un gen podrían tener como efecto una mayor concentración de la proteína (Tao *et al.*, 2005). En otras palabras, diferencias individuales en la cantidad de H β D-3, podrían estar genéticamente determinados, a diferencia de lo que ocurre con otro péptido antimicrobiano, LL-37, el cual sólo posee una copia de su gen, que está localizado en el cromosoma 3 y donde las concentraciones salivales de éste se presentan más estables en la población (Dale *et al.*, 2006).

Al analizar los índices de caries, antes del consumo del probiótico, se observa que la concentración de H β D-3 en saliva no estimulada no se relaciona con la prevalencia de caries, es decir, no existe un aumento o disminución de la concentración salival de este péptido, en presencia de lesiones de caries cavitadas en los niños, cuando se compara con la concentración de la proteína en niños sin lesiones de caries. Nuestros resultados difieren de los presentados por Ribeiro (Ribeiro *et al.*, 2013) donde mediante cromatografía detectó la presencia de esta defensina, en saliva no estimulada, y la relacionó con individuos sanos libres de caries, en este estudio los grupos se dividieron de igual manera que en nuestro trabajo, pero existen diferencias en la metodología de detección del péptido, ya que sólo detectaron la presencia o ausencia de éste y no observaron si existen variaciones en la concentración salival, cuando existen diferencias en la prevalencia de caries. Además, en el estudio de Ribeiro, el grupo estudiado fue de 106 niños y su rango etáreo va desde menores de 1 año hasta los 6 años, esto

sumado a lo anterior podría explicar las diferencias de resultados. Por otra parte, la cantidad de participantes son distintas, en nuestro estudio el grupo de prevalencia 0 tiene 29 niños, y el de prevalencia 1 tiene 13, a diferencia del estudio de Ribeiro donde los grupos tienen 48 y 58 sujetos respectivamente.

Además, se realizó un análisis por severidad de lesiones de caries, donde sujetos con un ceod mayor o igual a 3 presentaron una concentración salival mayor de H β D-3 que los sujetos sanos. Este resultado podría ser explicado por la función que cumple el componente microbiológico en el desarrollo de las lesiones de caries, donde la mayor presencia de lesiones podría estar relacionada con mayor presencia bacterias patógenas y sus productos inflamatorios (Loesche, 1986, Thibodeau and O'Sullivan, 1999), siendo éstos los principales estímulos para la síntesis de H β D-3 por parte de las células epiteliales a nivel oral (Harder *et al.*, 2001, Dhople *et al.*, 2006). En este caso nuestros resultados difieren de los presentados por Tao (Tao *et al.*, 2005), donde separa sus grupos al igual que nosotros por severidad de ceod, y no encuentra relación entre la concentración salival de H β D-3 en saliva no estimulada y la severidad de caries. En este estudio la muestra total de participantes fue de 149, cuya edad varía entre los 11 y los 15 años. Es posible que si nuestro tamaño de muestra fuera mayor o cercano al del estudio de Tao, los resultados podrían ser distintos, con lo cual las comparaciones serían más exactas.

Hasta el momento no podemos concluir que existe una relación fehaciente entre la concentración de H β D-3 y la presencia de lesiones de caries, ya que nuestros resultados deben complementarse con los recuentos de las principales

bacterias cariogénicas de los participantes en el estudio. Sin embargo, nuestro estudio describe por primera vez la concentración salival de H β D-3 en niños del rango etáreo estudiado.

El principal hallazgo de nuestro estudio, fue demostrar claramente y por primera vez, que el consumo regular de leche enriquecida con *Lactobacillus rhamnosus* SP1 provoca una disminución en la concentración salival de H β D-3, en niños pre-escolares, cuando se compara con individuos que no consumieron el probiótico. A nivel oral no existen otros estudios que busquen una relación entre el consumo de probióticos y la producción de defensinas, existiendo sólo teorías sobre cuál es su mecanismo de acción. Nuestros datos sugieren que a nivel oral esta cepa probiótica no estimula la producción de H β D-3 por parte de las células epiteliales, a diferencia de lo que ocurre a nivel intestinal donde se ha demostrado tanto *in vitro* (Schlee *et al.*, 2007, Wehkamp *et al.*, 2004) como en estudios clínicos (Moro-García *et al.*, 2013) que el consumo de cepas probióticas estimula la inmunidad innata intestinal a través de la estimulación de la síntesis de un péptido antimicrobiano inducible, como lo es H β D-2, el cual contribuye a potenciar la barrera epitelial intestinal. Es interesante resaltar que H β D-2, al igual que la H β D-3, tiene una producción inducible por parte de las células epiteliales, frente a estímulos bacterianos o inflamatorios (Harder *et al.*, 2001, Dhople *et al.*, 2006, Diamond *et al.*, 2008).

Las diferencias entre nuestros resultados y los encontrados a nivel intestinal, se podrían explicar por distintas razones, primero el biofilm presente a nivel intestinal posee características completamente distintas a las encontradas en

el biofilm oral, ambos poseen grupos de microorganismos organizados sobre una superficie, siendo éstos completamente distintos así como también el medio ambiente al cual están expuestos, y donde el epitelio oral es el único que es atravesado o interrumpido por tejidos duros. Otra posible razón que podría explicar estas diferencias radica en que el efecto de los probióticos tiende a ser cepa específico, es decir, que los beneficios de una cepa no necesariamente se aplican al resto de cepas o de otras especies probióticas (Williams, 2010), en los estudios *in vitro* de Wehkamp y Schlee se usaron cepas de *E. coli Nissle* 1917 y en el estudio clínico de Moro-García la cepa utilizada fue *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* 8481, por lo tanto, si las cepas utilizadas son distintas los efectos esperados también lo son. Adicionalmente la edad de los participantes, en el estudio clínico de Moro-García, fueron edades superiores a los 65 años, donde existe una inmunidad completamente distinta a la que presentan los pre-escolares y el tiempo de consumo fue de 6 meses, lo cual también podría estar influenciando estas diferencias.

La disminución de la H β D-3 observada en nuestro trabajo se podría explicar por los efectos que poseen las distintas cepas probióticas sobre las bacterias del biofilm oral. Existen estudios *in vitro* donde se ha estudiado su actividad metabólica (Hedberg *et al.*, 2008), la co-agregación (Twetman and Stecksén-Blicks, 2008), la inhibición del crecimiento (Keller *et al.*, 2011), la producción de bacteriocinas (Teughels *et al.*, 2008) y su presencia en superficies orales, saliva y biofilm en formación (Söderling *et al.*, 2011), estos estudios colectivamente sugieren un potencial rol, de las bacterias probióticas en la modulación de la ecología del biofilm oral. Existen además estudios clínicos que soportan esta

evidencia, donde el consumo regular de probióticos disminuye el número de streptococci cariogénicos en placa bacteriana y en saliva, posterior a su consumo (Näse *et al.*, 2001, Singh *et al.*, 2011, Campus *et al.*, 2014). Según lo anterior podríamos pensar que la disminución de las bacterias patógenas, producto del consumo de la cepa probiótica estudiada, disminuiría los componentes inflamatorios o citoquinas pro-inflamatorias, que se producen en respuesta a la colonización del biofilm, de esta forma se estarían eliminando los distintos estímulos que la célula necesita para poder producir la H β D-3. Es posible que este mecanismo sea además el responsable de la disminución de la variabilidad en la concentración de H β D-3 observada en el grupo experimental, y no observada en el grupo control, donde estas diferencias se mantienen sin cambios durante la intervención.

Resulta interesante pensar que el consumo regular de leche enriquecida con *Lactobacillus rhamnosus* SP1, lograría un equilibrio en el biofilm oral con la disminución de los principales microorganismos patógenos y sus productos inflamatorios, tendiendo a la homeostasis del sistema inmune innato en el cual los epitelios orales no producen H β D-3, como mecanismo de protección inicial frente a la colonización de los patógenos orales. Para poder confirmar lo anterior es necesario realizar recuento de bacterias patógenas en las muestras de saliva estudiadas. Actualmente se está realizando un estudio paralelo por el mismo equipo de investigación, cuyo objetivo es realizar recuento de bacterias patógenas en muestras de saliva, en otros participantes reclutados por el proyecto FONIS SA11I2035. A pesar de que estos individuos no corresponden a los reclutados en nuestro estudio, han sido sometidos a la misma intervención, en cuanto al

consumo de la leche suplementada con lactobacilos. Estos resultados nos permitirán un mayor acercamiento a dilucidar uno de los mecanismos de acción posibles de los probióticos a nivel oral y sus efectos sobre el sistema inmune innato, particularmente la producción de H β D-3.

Nuestros resultados contribuyen al conocimiento de algunas de las características de los mecanismos mediante los cuales actúan los probióticos a nivel oral, sin embargo se requiere una mayor cantidad de estudios para dilucidar de forma más completa la influencia del consumo de probióticos en la respuesta inmune oral.

10. CONCLUSIÓN.

El consumo de leche suplementada con *Lactobacillus rhamnosus* SP1, durante 14 meses, disminuye la concentración salival de H β D-3 en niños pre-escolares, disminuyendo también la variabilidad de ésta, entre los individuos participantes.

11. SUGERENCIAS.

En estudios futuros se sugiere cuantificar colonias bacterianas y sus productos inflamatorios y como éstos se ven afectados por el consumo de bacterias probióticas en relación a la síntesis de la H β D-3.

Ampliar la detección de péptidos antimicrobianos, con el objetivo de determinar si existe algún comportamiento sinérgico o patrón de comportamiento, que nos permita ir completando el conocimiento de los mecanismos de los probióticos a nivel oral.

Explorar en los mismos participantes del estudio, la concentración de H β D-3 en saliva varios meses luego terminado el consumo del probiótico, para poder evaluar durante cuanto tiempo se mantiene su efecto sobre este elemento de la inmunidad natural.

12. RESUMEN.

El uso de bacterias probióticas para la prevención de caries se basa en la modulación que hacen estas bacterias de los principales microorganismos cariogénicos presentes en el biofilm oral. Además existe evidencia que a nivel intestinal son capaces de estimular la inmunidad innata, a nivel oral no se conoce si estas bacterias poseen un efecto en los elementos del sistema inmune innato, específicamente en la concentración de H β D-3, es por esto que el objetivo de nuestro estudio fue determinar la concentración salival de H β D-3 en niños pre-escolares que consumieron, durante 14 meses, leche enriquecida con *Lactobacillus rhamnosus* SP1, y compararlas con niños que consumieron la leche sin el probiótico. En este estudio clínico participaron pre-escolares de 2 a 3 años pertenecientes a Jardines Infantiles de la Fundación Integra del área Metropolitana Nor-Poniente. Cada grupo, control y experimental, estaba formado por 21 niños, ambos consumieron 150 mL de leche en polvo parcialmente descremada al 12% (Macro Food S.A[®]), adicionalmente el grupo experimental consumió la leche suplementada con 10⁷ UFC/mL de *Lactobacillus rhamnosus* SP1. El consumo de la leche fue durante la tarde los 5 días de la semana que los niños asistieron al jardín, y fue preparada previa capacitación, por las manipuladoras de alimentos de cada establecimiento. Al inicio y a los 14 meses de consumo de la leche se recolectaron muestras de saliva no estimulada, la cual fue utilizada para medir la concentración salival de H β D-3, mediante test de ELISA. La concentración salival de H β D-3 se presentó altamente variable en la población, en el grupo control o placebo fue de 373,49 +- 541,82 pg/mL y en el grupo experimental o probiótico fue de 597,91 +- 743,28 pg/mL y a los 14 meses fue de 370 +- 468,97 pg/mL y 126,29

+/- 69,3 respectivamente. En el grupo control la concentración salival no varía con el consumo del probiótico ($p>0,05$) y en el grupo probiótico se produce un descenso de $471,6 \pm 745,5$ ($p<0,05$). Nuestros datos sugieren que el consumo regular durante 14 meses de leche enriquecida con *Lactobacillus rhamnosus* SP1 disminuye la concentración salival de H β D-3.

13. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

1. Abbate, G. M., Borghi, D., Passi, A. & Levrini, L. 2014. Correlation between unstimulated salivary flow, pH and streptococcus mutans, analysed with real time PCR, in caries-free and caries-active children. *Eur J Paediatr Dent*, 15, 51-4.
2. Abiko, Y., Nishimura, M. & Kaku, T. 2003. Defensins in saliva and the salivary glands. *Med Electron Microsc*, 36, 247-52.
3. Ahola, A. J., Yli-Knuuttila, H., Suomalainen, T., Poussa, T., Ahlström, A., Meurman, J. H. & Korpela, R. 2002. Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Arch Oral Biol*, 47, 799-804.
4. Badet, C. & Thebaud, N. B. 2008. Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. *Open Microbiol J*, 2, 38-48.
5. Bals, R. & Wilson, J. M. 2003. Cathelicidins--a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell Mol Life Sci*, 60, 711-20.
6. Bartie, K. L., Devine, D. A., Wilson, M. J. & Lewis, M. A. 2008. In vitro susceptibility of the *Streptococcus milleri* group to antimicrobial peptides. *Int Endod J*, 41, 586-92.
7. Bonifait, L., Chandad, F. & Grenier, D. 2009. Probiotics for oral health: myth or reality? *J Can Dent Assoc*, 75, 585-90.
8. Bowen, W. H. & Koo, H. 2011. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res*, 45, 69-86.
9. Brogden, K. A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 3, 238-50.
10. Böhling, A., Hagge, S. O., Roes, S., Podschun, R., Sahly, H., Harder, J., Schröder, J. M., Grötzinger, J., Seydel, U. & Gutschmann, T. 2006. Lipid-specific membrane activity of human beta-defensin-3. *Biochemistry*, 45, 5663-70.
11. Cabana, M. D., Shane, A. L., Chao, C. & Oliva-Hemker, M. 2006. Probiotics in primary care pediatrics. *Clin Pediatr (Phila)*, 45, 405-10.
12. Cagetti, M. G., Mastroberardino, S., Milia, E., Cocco, F., Lingström, P. & Campus, G. 2013. The use of probiotic strains in caries prevention: a systematic review. *Nutrients*, 5, 2530-50.
13. Caglar, E., Cildir, S. K., Ergeneli, S., Sandalli, N. & Twetman, S. 2006. Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium

- Lactobacillus reuteri ATCC 55730 by straws or tablets. *Acta Odontol Scand*, 64, 314-8.
14. Caglar, E., Kargul, B. & Tanboga, I. 2005. Bacteriotherapy and probiotics' role on oral health. *Oral Dis*, 11, 131-7.
 15. Caglar, E., Kavaloglu, S. C., Kuscu, O. O., Sandalli, N., Holgerson, P. L. & Twetman, S. 2007. Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Clin Oral Investig*, 11, 425-9.
 16. Caglar, E., Kuscu, O. O., Selvi Kuvvetli, S., Kavaloglu Cildir, S., Sandalli, N. & Twetman, S. 2008. Short-term effect of ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on the number of salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Acta Odontol Scand*, 66, 154-8.
 17. Campus, G., Cocco, F., Carta, G., Cagetti, M. G., Simark-Mattson, C., Strohmenger, L. & Lingström, P. 2014. Effect of a daily dose of *Lactobacillus brevis* CD2 lozenges in high caries risk schoolchildren. *Clin Oral Investig*, 18, 555-61.
 18. Ceballos M, Acevedo C. "Diagnóstico en Salud Bucal de niños de 2 y 4 años que asisten a la educación preescolar". Región Metropolitana, 2007 en www.minsal.cl.
 19. Dale, B. A. & Krisanaprakornkit, S. 2001. Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. *J Oral Pathol Med*, 30, 321-7.
 20. Dale, B. A., Tao, R., Kimball, J. R. & Jurevic, R. J. 2006. Oral antimicrobial peptides and biological control of caries. *BMC Oral Health*, 6 Suppl 1, S13.
 21. de Almeida, P. e. V., Grégio, A. M., Machado, M. A., de Lima, A. A. & Azevedo, L. R. 2008. Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J Contemp Dent Pract*, 9, 72-80.
 22. De Smet, K. & Contreras, R. 2005. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett*, 27, 1337-47.
 23. Dhople, V., Krukemeyer, A. & Ramamoorthy, A. 2006. The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochim Biophys Acta*, 1758, 1499-512.
 24. Diamond, G., Beckloff, N. & Ryan, L. K. 2008. Host defense peptides in the oral cavity and the lung: similarities and differences. *J Dent Res*, 87, 915-27.
 25. Diamond, G., Beckloff, N., Weinberg, A. & Kisich, K. O. 2009. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr Pharm Des*, 15, 2377-92.

26. Duits, L. A., Ravensbergen, B., Rademaker, M., Hiemstra, P. S. & Nibbering, P. H. 2002. Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology*, 106, 517-25.
27. Dunsche, A., Açil, Y., Dommisch, H., Siebert, R., Schröder, J. M. & Jepsen, S. 2002. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *Eur J Oral Sci*, 110, 121-4.
28. Edgerton, M. & Koshlukova, S. E. 2000. Salivary histatin 5 and its similarities to the other antimicrobial proteins in human saliva. *Adv Dent Res*, 14, 16-21.
29. Erickson, K. L. & Hubbard, N. E. 2000. Probiotic immunomodulation in health and disease. *J Nutr*, 130, 403S-409S.
30. Falk, W., Goodwin, R. H. & Leonard, E. J. 1980. A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *J Immunol Methods*, 33, 239-47.
31. Featherstone, J. D. 2003. The caries balance: contributing factors and early detection. *J Calif Dent Assoc*, 31, 129-33.
32. Featherstone, J. D. 2004. The continuum of dental caries--evidence for a dynamic disease process. *J Dent Res*, 83 Spec No C, C39-42.
33. Featherstone, J. D., Adair, S. M., Anderson, M. H., Berkowitz, R. J., Bird, W. F., Crall, J. J., Den Besten, P. K., Donly, K. J., Glassman, P., Milgrom, P., Roth, J. R., Snow, R. & Stewart, R. E. 2003. Caries management by risk assessment: consensus statement, April 2002. *J Calif Dent Assoc*, 31, 257-69.
34. Feng, Z., Jiang, B., Chandra, J., Ghannoum, M., Nelson, S. & Weinberg, A. 2005. Human beta-defensins: differential activity against candidal species and regulation by *Candida albicans*. *J Dent Res*, 84, 445-50.
35. Flichy-Fernández, A. J., Alegre-Domingo, T., Peñarrocha-Oltra, D. & Peñarrocha-Diago, M. 2010. Probiotic treatment in the oral cavity: an update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 15, e677-80.
36. Floch, M. H., Walker, W. A., Madsen, K., Sanders, M. E., Macfarlane, G. T., Flint, H. J., Dieleman, L. A., Ringel, Y., Guandalini, S., Kelly, C. P. & Brandt, L. J. 2011. Recommendations for probiotic use-2011 update. *J Clin Gastroenterol*, 45 Suppl, S168-71.
37. Fontana, M., Young, D. A. & Wolff, M. S. 2009. Evidence-based caries, risk assessment, and treatment. *Dent Clin North Am*, 53, 149-61, x.

38. Ganz, T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 3, 710-20.
39. Ganz, T. 2004. Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *C R Biol*, 327, 539-49.
40. Goebel, C., Mackay, L. G., Vickers, E. R. & Mather, L. E. 2000. Determination of defensin HNP-1, HNP-2, and HNP-3 in human saliva by using LC/MS. *Peptides*, 21, 757-65.
41. Gomes, P. e. S. & Fernandes, M. H. 2010. Defensins in the oral cavity: distribution and biological role. *J Oral Pathol Med*, 39, 1-9.
42. Gordon, Y. J., Huang, L. C., Romanowski, E. G., Yates, K. A., Proske, R. J. & McDermott, A. M. 2005. Human cathelicidin (LL-37), a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity. *Curr Eye Res*, 30, 385-94.
43. Hancock, R. E. 2001. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis*, 1, 156-64.
44. Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. & Schroder, J. M. 2001. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem*, 276, 5707-13.
45. Harder, J., Siebert, R., Zhang, Y., Matthiesen, P., Christophers, E., Schlegelberger, B. & Schröder, J. M. 1997. Mapping of the gene encoding human beta-defensin-2 (DEFB2) to chromosome region 8p22-p23.1. *Genomics*, 46, 472-5.
46. Hasslöf, P., West, C. E., Videhult, F. K., Brandelius, C. & Stecksén-Blicks, C. 2013. Early intervention with probiotic *Lactobacillus paracasei* F19 has no long-term effect on caries experience. *Caries Res*, 47, 559-65.
47. He, X., Lux, R., Kuramitsu, H. K., Anderson, M. H. & Shi, W. 2009. Achieving probiotic effects via modulating oral microbial ecology. *Adv Dent Res*, 21, 53-6.
48. Hedberg, M., Hasslöf, P., Sjöström, I., Twetman, S. & Stecksén-Blicks, C. 2008. Sugar fermentation in probiotic bacteria--an in vitro study. *Oral Microbiol Immunol*, 23, 482-5.
49. Hollox, E. J., Armour, J. A. & Barber, J. C. 2003. Extensive normal copy number variation of a beta-defensin antimicrobial-gene cluster. *Am J Hum Genet*, 73, 591-600.

50. Hoover, D. M., Wu, Z., Tucker, K., Lu, W. & Lubkowski, J. 2003. Antimicrobial characterization of human beta-defensin 3 derivatives. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 2804-9.
51. Humphrey, S. P. & Williamson, R. T. 2001. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*, 85, 162-9.
52. Ismail, A. I., Sohn, W., Tellez, M., Amaya, A., Sen, A., Hasson, H. & Pitts, N. B. 2007. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol*, 35, 170-8.
53. Jia, H. P., Schutte, B. C., Schudy, A., Linzmeier, R., Guthmiller, J. M., Johnson, G. K., Tack, B. F., Mitros, J. P., Rosenthal, A., Ganz, T. & McCray, P. B. 2001. Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene*, 263, 211-8.
54. Joly, S., Maze, C., McCray, P. B. & Guthmiller, J. M. 2004. Human beta-defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. *J Clin Microbiol*, 42, 1024-9.
55. Kaufman, E. & Lamster, I. B. 2002. The diagnostic applications of saliva--a review. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13, 197-212.
56. Keller, M. K., Hasslöf, P., Stecksén-Blicks, C. & Twetman, S. 2011. Co-aggregation and growth inhibition of probiotic lactobacilli and clinical isolates of mutans streptococci: an in vitro study. *Acta Odontol Scand*, 69, 263-8.
57. Klüver, E., Schulz-Maronde, S., Scheid, S., Meyer, B., Forssmann, W. G. & Adermann, K. 2005. Structure-activity relation of human beta-defensin 3: influence of disulfide bonds and cysteine substitution on antimicrobial activity and cytotoxicity. *Biochemistry*, 44, 9804-16.
58. Krisanaprakornkit, S., Weinberg, A., Perez, C. N. & Dale, B. A. 1998. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun*, 66, 4222-8.
59. Kumari, A., Catanzaro, R. & Marotta, F. 2011. Clinical importance of lactic acid bacteria: a short review. *Acta Biomed*, 82, 177-80.
60. Lee, J. K., Chang, S. W., Perinpanayagam, H., Lim, S. M., Park, Y. J., Han, S. H., Baek, S. H., Zhu, Q., Bae, K. S. & Kum, K. Y. 2013. Antibacterial efficacy of a human β -defensin-3 peptide on multispecies biofilms. *J Endod*, 39, 1625-9.

61. Linzmeier, R., Ho, C. H., Hoang, B. V. & Ganz, T. 1999. A 450-kb contig of defensin genes on human chromosome 8p23. *Gene*, 233, 205-11.
62. Liu, L., Wang, L., Jia, H. P., Zhao, C., Heng, H. H., Schutte, B. C., McCray, P. B. & Ganz, T. 1998. Structure and mapping of the human beta-defensin HBD-2 gene and its expression at sites of inflammation. *Gene*, 222, 237-44.
63. Loesche, W. J. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*, 50, 353-80.
64. Lu, Q., Samaranayake, L. P., Darveau, R. P. & Jin, L. 2005. Expression of human beta-defensin-3 in gingival epithelia. *J Periodontal Res*, 40, 474-81.
65. Madhwani, T. & McBain, A. J. 2012. Compositional modification of nascent in vitro dental plaques by human host-defence peptides. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 64, 374-81.
66. Maisetta, G., Batoni, G., Esin, S., Luperini, F., Pardini, M., Bottai, D., Florio, W., Giuca, M. R., Gabriele, M. & Campa, M. 2003. Activity of human beta-defensin 3 alone or combined with other antimicrobial agents against oral bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 3349-51.
67. Maisetta, G., Batoni, G., Esin, S., Raco, G., Bottai, D., Favilli, F., Florio, W. & Campa, M. 2005. Susceptibility of *Streptococcus mutans* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to bactericidal activity of human beta-defensin 3 in biological fluids. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 1245-8.
68. Mathews, M., Jia, H. P., Guthmiller, J. M., Losh, G., Graham, S., Johnson, G. K., Tack, B. F. & McCray, P. B., Jr. 1999. Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun*, 67, 2740-5.
69. Meurman, J. H. 2005. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *Eur J Oral Sci*, 113, 188-96.
70. Meurman, J. H. & Stamatova, I. 2007. Probiotics: contributions to oral health. *Oral Dis*, 13, 443-51.
71. Moro-García, M. A., Alonso-Arias, R., Baltadjieva, M., Fernández Benítez, C., Fernández Barrial, M. A., Díaz Ruisánchez, E., Alonso Santos, R., Alvarez Sánchez, M., Saavedra Miján, J. & López-Larrea, C. 2013. Oral supplementation with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 8481 enhances systemic immunity in elderly subjects. *Age (Dordr)*, 35, 1311-26.
72. Nikawa, H., Makihira, S., Fukushima, H., Nishimura, H., Ozaki, Y., Ishida, K., Darmawan, S., Hamada, T., Hara, K., Matsumoto, A., Takemoto, T. & Aimi, R.

2004. *Lactobacillus reuteri* in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. *Int J Food Microbiol*, 95, 219-23.
73. Näse, L., Hatakka, K., Savilahti, E., Saxelin, M., Pönkä, A., Poussa, T., Korpela, R. & Meurman, J. H. 2001. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res*, 35, 412-20.
74. Olate, S., Muñoz, D., Neumann, S., Pozzer, L., Cavalieri-Pereira, L. & de Moraes, M. 2014. A descriptive study of the oral status in subjects with Sjögren's syndrome. *Int J Clin Exp Med*, 7, 1140-4.
75. Ouhara, K., Komatsuzawa, H., Yamada, S., Shiba, H., Fujiwara, T., Ohara, M., Sayama, K., Hashimoto, K., Kurihara, H. & Sugai, M. 2005. Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, {beta}-defensins and LL37, produced by human epithelial cells. *J Antimicrob Chemother*, 55, 888-96.
76. Pereira, A. G., Neves, A. M. & Trindade, A. C. 2010. [Immunology of dental caries]. *Acta Med Port*, 23, 663-8.
77. Peretz, B., Ram, D., Azo, E. & Efrat, Y. 2003. Preschool caries as an indicator of future caries: a longitudinal study. *Pediatr Dent*, 25, 114-8.
78. Petti, S., Tarsitani, G. & Simonetti D'Arca, A. 2008. Antibacterial activity of yoghurt against viridans streptococci in vitro. *Arch Oral Biol*, 53, 985-90.
79. Phattarataratip, E., Olson, B., Broffitt, B., Qian, F., Brogden, K. A., Drake, D. R., Levy, S. M. & Banas, J. A. 2011. *Streptococcus mutans* strains recovered from caries-active or caries-free individuals differ in sensitivity to host antimicrobial peptides. *Mol Oral Microbiol*, 26, 187-99.
80. Raj, P. A. & Dentino, A. R. 2002. Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiol Lett*, 206, 9-18.
81. Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M. T. & McCormick, J. K. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev*, 16, 658-72.
82. Ribeiro, T. R., Dria, K. J., de Carvalho, C. B., Monteiro, A. J., Fonteles, M. C., de Moraes Carvalho, K. & Fonteles, C. S. 2013. Salivary peptide profile and its association with early childhood caries. *Int J Paediatr Dent*, 23, 225-34.
83. Ryan, L. K., Diamond, G., Amrute, S., Feng, Z., Weinberg, A. & Fitzgerald-Bocarsly, P. 2003. Detection of HBD1 peptide in peripheral blood mononuclear cell subpopulations by intracellular flow cytometry. *Peptides*, 24, 1785-94.

84. Saha, S., Tomaro-Duchesneau, C., Tabrizian, M. & Prakash, S. 2012. Probiotics as oral health biotherapeutics. *Expert Opin Biol Ther*, 12, 1207-20.
85. Sahasrabudhe, K. S., Kimball, J. R., Morton, T. H., Weinberg, A. & Dale, B. A. 2000. Expression of the antimicrobial peptide, human beta-defensin 1, in duct cells of minor salivary glands and detection in saliva. *J Dent Res*, 79, 1669-74.
86. Sazawal, S., Hiremath, G., Dhingra, U., Malik, P., Deb, S. & Black, R. E. 2006. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *Lancet Infect Dis*, 6, 374-82.
87. Scheie, A. A. & Petersen, F. C. 2004. THE BIOFILM CONCEPT: CONSEQUENCES FOR FUTURE PROPHYLAXIS OF ORAL DISEASES? *Crit Rev Oral Biol Med*, 15, 4-12.
88. Schibli, D. J., Hunter, H. N., Aseyev, V., Starner, T. D., Wiencek, J. M., McCray, P. B., Tack, B. F. & Vogel, H. J. 2002. 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*, 277, 8279-89.
89. Schlee, M., Wehkamp, J., Altenhoefer, A., Oelschlaeger, T. A., Stange, E. F. & Fellermann, K. 2007. Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect Immun*, 75, 2399-407.
90. Selwitz, R. H., Ismail, A. I. & Pitts, N. B. 2007. Dental caries. *Lancet*, 369, 51-9.
91. Shelburne, C. E., Coulter, W. A., Olguin, D., Lantz, M. S. & Lopatin, D. E. 2005. Induction of {beta}-defensin resistance in the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 183-7.
92. Shivakumar, K., Prasad, S. & Chandu, G. 2009. International Caries Detection and Assessment System: A new paradigm in detection of dental caries. *J Conserv Dent*, 12, 10-6.
93. Simark-Mattsson, C., Emilson, C. G., Håkansson, E. G., Jacobsson, C., Roos, K. & Holm, S. 2007. Lactobacillus-mediated interference of mutans streptococci in caries-free vs. caries-active subjects. *Eur J Oral Sci*, 115, 308-14.
94. Singh, R. P., Damle, S. G. & Chawla, A. 2011. Salivary mutans streptococci and lactobacilli modulations in young children on consumption of probiotic ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb12 and *Lactobacillus acidophilus* La5. *Acta Odontol Scand*, 69, 389-94.

95. Song, W., Shi, Y., Xiao, M., Lu, H., Qu, T., Li, P., Wu, G. & Tian, Y. 2009. In vitro bactericidal activity of recombinant human beta-defensin-3 against pathogenic bacterial strains in human tooth root canal. *Int J Antimicrob Agents*, 33, 237-43.
96. Srinivasulu, G., Fareed, N., Sudhir, K. M. & Krishna Kumar, R. V. 2014. Relationship between stimulated salivary factors, dental caries status and nutritional condition among institutionalized elderly people. *Oral Health Dent Manag*, 13, 49-53.
97. Stamatova, I. & Meurman, J. H. 2009. Probiotics: health benefits in the mouth. *Am J Dent*, 22, 329-38.
98. Starner, T. D., Agerberth, B., Gudmundsson, G. H. & McCray, P. B. 2005. Expression and activity of beta-defensins and LL-37 in the developing human lung. *J Immunol*, 174, 1608-15.
99. 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, 374-81.
100. Stensson, M., Koch, G., Coric, S., Abrahamsson, T. R., Jenmalm, M. C., Birkhed, D. & Wendt, L. K. 2014. Oral administration of *Lactobacillus reuteri* during the first year of life reduces caries prevalence in the primary dentition at 9 years of age. *Caries Res*, 48, 111-7.
101. Svinarich, D. M., Wolf, N. A., Gomez, R., Gonik, B. & Romero, R. 1997. Detection of human defensin 5 in reproductive tissues. *Am J Obstet Gynecol*, 176, 470-5.
102. Söderling, E. M., Marttinen, A. M. & Haukioja, A. L. 2011. Probiotic lactobacilli interfere with *Streptococcus mutans* biofilm formation in vitro. *Curr Microbiol*, 62, 618-22.
103. Taggart, C. C., Greene, C. M., Smith, S. G., Levine, R. L., McCray, P. B., O'Neill, S. & McElvaney, N. G. 2003. Inactivation of human beta-defensins 2 and 3 by elastolytic cathepsins. *J Immunol*, 171, 931-7.
104. Taipale, T., Pienihäkkinen, K., Alanen, P., Jokela, J. & Söderling, E. 2013. Administration of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in early childhood: a post-trial effect on caries occurrence at four years of age. *Caries Res*, 47, 364-72.
105. Tani, K., Murphy, W. J., Chertov, O., Salcedo, R., Koh, C. Y., Utsunomiya, I., Funakoshi, S., Asai, O., Herrmann, S. H., Wang, J. M., Kwak, L. W. & Oppenheim, J. J. 2000. Defensins act as potent adjuvants that promote cellular and humoral

- immune responses in mice to a lymphoma idiotype and carrier antigens. *Int Immunol*, 12, 691-700.
106. Tanzer, J. M., Livingston, J. & Thompson, A. M. 2001. The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ*, 65, 1028-37.
107. Tao, R., Jurevic, R. J., Coulton, K. K., Tsutsui, M. T., Roberts, M. C., Kimball, J. R., Wells, N., Berndt, J. & Dale, B. A. 2005. Salivary antimicrobial peptide expression and dental caries experience in children. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 3883-8.
108. Teughels, W., Van Essche, M., Sliepen, I. & Quirynen, M. 2008. Probiotics and oral health care. *Periodontol 2000*, 48, 111-47.
109. Thibodeau, E. A. & O'Sullivan, D. M. 1999. Salivary mutans streptococci and caries development in the primary and mixed dentitions of children. *Community Dent Oral Epidemiol*, 27, 406-12.
110. Tinanoff, N., Kanellis, M. J. & Vargas, C. M. 2002. Current understanding of the epidemiology mechanisms, and prevention of dental caries in preschool children. *Pediatr Dent*, 24, 543-51.
111. Twetman, L., Larsen, U., Fiehn, N. E., Stecksén-Blicks, C. & Twetman, S. 2009. Coaggregation between probiotic bacteria and caries-associated strains: an in vitro study. *Acta Odontol Scand*, 67, 284-8.
112. Twetman, S. 2012. Are we ready for caries prevention through bacteriotherapy? *Braz Oral Res*, 26 Suppl 1, 64-70.
113. Twetman, S. & Keller, M. K. 2012. Probiotics for caries prevention and control. *Adv Dent Res*, 24, 98-102.
114. Twetman, S. & Stecksén-Blicks, C. 2008. Probiotics and oral health effects in children. *Int J Paediatr Dent*, 18, 3-10.
115. Underwood, M. A. & Bevins, C. L. 2010. Defensin-barbed innate immunity: clinical associations in the pediatric population. *Pediatrics*, 125, 1237-47.
116. Van Nieuw Amerongen, A., Bolscher, J. G. & Veerman, E. C. 2004. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res*, 38, 247-53.
117. Wehkamp, J., Harder, J., Wehkamp, K., Wehkamp-von Meissner, B., Schlee, M., Enders, C., Sonnenborn, U., Nuding, S., Bengmark, S., Fellermann, K., Schröder, J. M. & Stange, E. F. 2004. NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun*, 72, 5750-8.

118. Williams, N. T. 2010. Probiotics. *Am J Health Syst Pharm*, 67, 449-58.
119. Wu, Z., Ericksen, B., Tucker, K., Lubkowski, J. & Lu, W. 2004. Synthesis and characterization of human alpha-defensins 4-6. *J Pept Res*, 64, 118-25.
120. Wu, Z., Hoover, D. M., Yang, D., Boulègue, C., Santamaria, F., Oppenheim, J. J., Lubkowski, J. & Lu, W. 2003. Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 8880-5.
121. Yang, D., Biragyn, A., Hoover, D. M., Lubkowski, J. & Oppenheim, J. J. 2004. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol*, 22, 181-215.
122. Yanine, N., Araya, I., Brignardello-Petersen, R., Carrasco-Labra, A., González, A., Preciado, A., Villanueva, J., Sanz, M. & Martin, C. 2013. Effects of probiotics in periodontal diseases: a systematic review. *Clin Oral Investig*, 17, 1627-34.
123. Yli-Knuutila, H., Snäll, J., Kari, K. & Meurman, J. H. 2006. Colonization of *Lactobacillus rhamnosus* GG in the oral cavity. *Oral Microbiol Immunol*, 21, 129-31.
124. Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415, 389-95.
125. Zhao, C., Wang, I. & Lehrer, R. I. 1996. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett*, 396, 319-22.
126. Zhu, C., Tan, H., Cheng, T., Shen, H., Shao, J., Guo, Y., Shi, S. & Zhang, X. 2013. Human β -defensin 3 inhibits antibiotic-resistant *Staphylococcus* biofilm formation. *J Surg Res*, 183, 204-13.

14. ANEXOS.

Anexo N°1: Acta de aprobación comité de ética.



06/12/2011

ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

ACTA N°: 2011/13

1. Acta De Aprobación De Protocolo De Estudio N° 2011/14.
2. Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:

Prof. Dr. Juan Cortés A Presidente CE	Prof. Dra. M ^a Angélica Torres V. Secretaria CE	Dr. Eduardo Rodríguez Y. Miembro permanente del CE
Dra. Macarena Miranda V Miembro permanente del CE	Srta. Valentina Fajreldin Miembro permanente del CE	Prof. Dra. Ximena Lee Miembro permanente del CE
Prof. Dr. Alejandro Escobar Miembro permanente del CE	Srta. Karin Lagos Miembro permanente del CE	Dra. Claudia Lefimil Miembro permanente del CE
3. Fecha d Aprobación: 30/11/2011
4. Título completo del proyecto: "Efecto del consumo de bebidas lácteas enriquecidas con probióticos lactobacilos en la reducción de incidencia de lesiones de caries en niños preescolares" Proyecto Fonis SA1112035
5. Investigador responsable: Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez
6. Institución: Departamento de Odontología Restauradora, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
7. Documentación Revisada:
 - CV del Investigador principal y de los Coinvestigadores
8. Formulario de Consentimiento Informado (CI) en español para el proyecto: "Efecto del consumo de bebidas lácteas enriquecidas con probióticos lactobacilos en la reducción de incidencia de lesiones de caries en niños preescolares"
9. Carácter de la población: La población objetivo es la de niños y niñas de 2 años, que asisten a educación preescolar en establecimientos dependientes de la Fundación INTEGRAL en la Región Metropolitana en Chile (niños que pertenecen a familias en situación de pobreza y/o vulnerabilidad social). Se seleccionará una muestra de niños sanos y con buena salud bucal.

ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

10. Fundamentación de la aprobación:

La caries dental sigue siendo la principal enfermedad bucal en niños a nivel mundial y en nuestro país aún se presenta una alta prevalencia y severidad de caries, cuyo tratamiento convencional es la restauración, con un alto costo económico y social. Este proyecto propone el uso de probióticos en bebidas lácteas (microorganismos que administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud, lactobacilli son particularmente protectores para la salud bucal), como posible reductor de caries en niños preescolares de 2 años de edad.

La seguridad del uso de probióticos en bebidas lácteas tiene relación con el principio de No maleficencia y no ha mostrado riesgo de daño aumentado, reportándose escasos efectos adversos los cuales han sido difíciles de evaluar, dada la levedad de sus signos tales como flatulencia y molestia abdominal autolimitada. En esta investigación además se implementará un protocolo de registro y manejo de los posibles efectos adversos, con la supervisión del médico parte del equipo investigador. Se registrarán en forma diaria las alteraciones gastrointestinales que se han reportado por el uso de probióticos y presentan un protocolo correcto de notificación de esos efectos al comité de ética.

El Investigador presenta un protocolo de entrega de la información para padres, apoderados y tutores de los niños posibles candidatos, esta información aparece clara y personalizada, y culmina con la firma del formulario de consentimiento informado donde los padres o tutores certifican que han comprendido esta información y aceptan los riesgos y beneficios que representa que sus niños participen en esta investigación. Este Comité considera que se resguarda así el principio de autonomía.

Después del primer examen bucal en los jardines seleccionados, los padres de los niños que presenten en ese momento algún tipo de lesión cariosa, serán informados y se les entregará una hoja de interconsulta y recomendaciones para la resolución de los problemas de salud bucal. Además, los niños que desarrollen lesiones de caries durante el estudio serán derivados a atención clínica a la clínica odontológica dependiente de la Universidad de Chile o al sistema de salud que le corresponda. Estas acciones concuerdan con el respeto al principio de Beneficencia.

Este proyecto ha mostrado que cumple con las pautas éticas de investigación en seres humanos (Helsinki y CIOM).

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Aprueba el estudio: "Efecto del consumo de bebidas lácteas enriquecidas con probióticos lactobacilos en la reducción de incidencia de lesiones de caries en niños preescolares" Proyecto Fonis SA1112035, bajo la supervisión del Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez, como Investigador Principal.

Este Comité se reserva el derecho de monitorear este proyecto si fuera necesario.

Prof. Dr. Juan Cortes A
Presidente CEC-FOUCH



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

Anexo N° 2: Consentimiento Informado.



Facultad de Odontología, U de Chile
Departamento de Odontología Restauradora

Fonis
FONOS EN LINEA EN ENTORNOS
Y ENTORNOS DE TRABAJO
Ed 29/05/2012

CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

1. INFORMACION SOBRE EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el propósito del estudio?

Este estudio tiene por objetivo evaluar el efecto del consumo de probióticos para prevenir las caries en niños preescolares.

¿Qué son los probióticos?

Los probióticos se definen como microorganismos vivos los cuales, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios a quien los consume. En Chile, existen numerosos productos en el mercado que contienen probióticos y que son consumidos para obtener beneficios a nivel gastrointestinal. Estudios en el extranjero han demostrado utilidad en prevenir la aparición de caries en los niños.

¿Quién puede participar en este estudio?

Niños y niñas que asistan a jardines infantiles dependientes de la Fundación INTEGRA que cursen nivel medio menor y que no presenten intolerancia a la lactosa y/o alergia a algunos de los componentes de la leche.

¿Por qué debiera yo considerar la participación de mi hijo/a o pupilo/a como sujeto de investigación en este estudio?

Para colaborar en la evaluación del efecto del consumo de probióticos en la prevención de caries dentales y dado que los efectos negativos que pudieran tener los probióticos son mínimos.

¿Mi hijo/a tiene necesariamente que participar en este estudio? ¿Si acepto que mi hijo/a participe, puedo cambiar de opinión o retirarme?

Su participación es voluntaria, puede cambiar de opinión o retirarse en el momento que desee.

¿Si decido que mi hijo/a participe en el estudio, en que consisten precisamente las evaluaciones, y que tipo de tratamientos o procedimientos le van a practicar?

Consistirá en una primera etapa, en hacerles una evaluación odontológica inicial (basal) y tomar una muestra de saliva. Luego el jardín recibirá gratuitamente leche con probióticos o sin ellos por parte del grupo investigador, los cuales serán consumidos por su hijo/a todos los días que asista al jardín, por un período de 18 meses.

Se decidirá por azar el tipo de leche (con o sin probiótico) que recibirán los jardines y por lo tanto su hijo, puede que esté consumiendo leche con probióticos o sin probióticos.

En una segunda etapa, los niños serán nuevamente examinados en el jardín (a los 6 meses, 12 meses y a los 18 meses) y se les solicitarán nuevas muestra de saliva. El examen de salud es muy simple y sólo incluye la observación de los dientes con un espejo dental en el mismo jardín. La muestra de saliva consiste en tomar saliva desde la boca del niño (el la escupirá en un frasquito) y esta será empleada únicamente para análisis microbiológicos, es decir en la medición de la cantidad de bacterias que producen las caries.

¿Qué peligros podría experimentar mi hijo/a en este estudio, y que harán los investigadores para reducir el riesgo de que éstos se presenten?

Este estudio no representa ningún peligro para los participantes ya que no hay procedimientos ni medicamentos que involucren riesgo alguno. Es muy raro, pero puede ocurrir que algunos participantes presenten algún síntoma gastrointestinal como diarrea, náuseas y/o dolor abdominal leve. Un médico, parte del equipo investigador, evaluará estos síntomas y en el caso de persistir en el tiempo y alterar la calidad de vida de su hijo/a, se suspenderá el consumo del producto.



¿Qué beneficios para mi hijo/a puedo yo esperar al autorizar que participe en este estudio?

- 1) Su hijo/a consumirá una leche de muy buena calidad.
- 2) En el caso de consumir la leche con probiótico, estará consumiendo un producto seguro y ampliamente estudiado, que presenta beneficios a nivel gastrointestinal, potenciando los sistemas de defensa naturales del cuerpo.
- 3) A su hijo/a se le realizará una evaluación de su salud bucal y estará constantemente monitoreado por un equipo de odontólogos especializados, y en el caso de necesitar atención odontológica, será derivado a atención a la red de salud que le corresponda.

¿En qué podría este estudio beneficiar a otros?

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.

¿Qué harán los investigadores si mi hijo/a sufre algún daño durante el estudio?

No sufrirá ningún daño, ya que no se utilizan compuestos que puedan ocasionarlo. En caso que presente molestias y que estas aumenten desmedidamente con el consumo de la leche, éste se le suspenderá.

Una vez que mi hijo/a haya ingresado como sujeto de estudio, ¿a quien tendría que dirigirme para averiguar más acerca del estudio o para hacer llegar algún comentario y/o resolver alguna duda?

Al investigador responsable, Dr. Gonzalo Rodríguez (F: 09-5426731) o al investigador alterno, Dr. Rodrigo Cabello (F: 09-4393501). También pueden consultar al Presidente del Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Dr. Juan Cortés (F: 9781703)

Si decido que mi hijo/a no participe en este estudio, ¿qué me puede suceder?

La participación del estudio es de carácter voluntario, si Ud. decide retirar a su hijo/a, no habrá ninguna consecuencia negativa para Ud. ni para su hijo/a.

¿Después que firme el documento, quien lo guardará?

El investigador responsable Dr. Gonzalo Rodríguez M. que trabaja en Cariología en el Departamento de Odontología Restauradora de las Facultad de Odontología de la Universidad de Chile

Comité Ético Científico Facultad de Odontología U. de Chile
Presidente: Dr. Juan Cortés
Teléfono: 9781702
Dirección: Sergio Livingstone P. 943. Independencia. Of 4º Piso

2. DOCUMENTACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, yo _____
RUT _____ otorgo mi consentimiento para que mi hijo o mi hija
_____ participe en el proyecto
"Efecto del consumo de leche enriquecida con probióticos lactobacilos en la reducción de incidencia de caries en niños preescolares", dependiente de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

.....
(Firma del Tutor del Niño)

.....
(Fecha)

.....
(Firma del Investigador que toma el CI)

.....
(Fecha)

.....
(Firma del Investigador Principal) CI

.....
(Fecha)

Santiago, de 2012

Comité Ético Científico Facultad de Odontología U. de Chile
Presidente: Dr. Juan Cortés
Teléfono: 9781702

PAG 3 DE 3



Anexo N°3:Ficha técnica de *Lactobacillus rhamnosus* SP1.



Lactobacillus rhamnosus SP 1

Information sheet

Description	Species	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LRH08.						
	Origin	Human origin.						
	Deposit	DSM 21690.						
	ID method	The taxonomical identification has been achieved by sequencing the gene coding for 16S rRNA and by using species-specific PCR analysis. Strain typing was performed by using RAPD and REP-PCR techniques.						
	Characteristics	Microaerophilic, Gram positive rod. SP 1 is facultative heterofermentative and produces L-lactic acid from fermentation of glucose.						
Culture Information	Microscopy (MRS broth, 37°C, overnight)	Short to medium long rods as single cells, in pairs or as twisted chains. Medium diameter.						
	Morphology (HHD, anaerobic, 37°C, 3 days)	Polymorphic: All colonies circular with regular edge. A-type: dark green with brown rim. B-type: brilliant green with clear rim.						
	Growth at (MRS broth, 2% inoculation, overnight)	<table border="1"> <thead> <tr> <th>15°C</th> <th>37°C</th> <th>45°C</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> </tbody> </table>	15°C	37°C	45°C	+	+	+
	15°C	37°C	45°C					
+	+	+						
Probiotic properties								
	Optimal temperature for growth	37°C						
	Acid tolerance ¹	+++						
	Bile tolerance ²	A: +++, B: ++, C: -						
	Simulated gastric juice ³	+++						
	Simulated pancreatic juice ⁴	+++						
	Adherence test ⁵	5.6%						
	Adherence test ⁶	32%						

Method 1-4 were conducted with cells from over-night cultures (MRS broth, 37°C) which were washed and re-suspended in water to approx. 10⁷ CFU/ml. Survival rate (MRS-6.5, anaerobic, 37°C) was calculated as log CFU/ml exposed culture compared to non-exposed culture grown under the same conditions. Sacco methods.

Rating: +++: >95%, ++: 85%-95%, +: 75%-84%, -: <75%

- Method: Survival at pH 3 (HC) in the ratio 1:1 for 30 min. at ambient temperature.
- Method: MRS-6.5 agar with or without A: + 0.5% oxgall, B: + 0.5% bovine bile or C: + 0.5% porcine bile.
- Method: Growth in solution of 0.3% pepsin, 0.5% NaCl buffered at pH 2 in the ratio 1:1 for 30 min. at 37°C.
- Method: Growth in solution of 0.1% pancreatin, 0.5% NaCl buffered at pH 8 in the ratio 1:1 for 30 min. at 37°C.
- Method: Adhesion to intestinal cells: Caco-2 cells and methods as described in Facinelli B. et al. 1998, Microbiology 14:109 and Jacobsen et al., 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65:4949. Università degli Studi, Ancona.
- Method: Adhesion to mucus as described in Ouweland A.C. et al. 2000, Letters in Applied Microbiology.




Lactobacillus rhamnosus SP 1

Information sheet

Heavy metal specification

Pb (lead)	<1 ppm (mg/kg)
Hg (mercury)	<0.03 ppm
Cd (cadmium)	<0.1 ppm

The level of heavy metals is controlled by raw material specifications. Random control is conducted on finished starter culture.

Microbiological specification

<i>Bacillus cereus</i>	<100 CFU/g	Method: Sacco M 10
Coagulase positive staphylococci*	<1 CFU/g	Method: Sacco M 27
<i>Enterobacteriaceae</i>	<10 CFU/g	Method: Sacco M 2
<i>Escherichia coli</i>	Not detected in 25 g	Method: Sacco M 13
<i>Listeria monocytogenes</i> *	<10 CFU/g	Method: Sacco M 3
Moulds & yeasts	Not detected in 25 g	Method: Sacco M 12
<i>Salmonella spp</i> *	<10 CFU/g	Method: Sacco M 11

**Analysed on regular basis. Analytical methods are available upon request.*

GMO

The microbial strain is not genetically modified (GM) in accordance with the European Directive 90/220/CEE. The strain is isolated from natural sources. The raw materials used are also GM free in accordance with Regulative 1829 and 1830/2003. Special statement available upon request.

Allergens

Special statement is available upon request.

Safety information

Material Safety Data Sheet available on www.saccosrl.it.

Certificate

Certificate of Analysis is available upon request.

ISO Kosher approval

Sacco S.r.l. is UNI EN ISO 9001:2008 certified. *Lactobacillus rhamnosus* SP 1 is  approved.

Service

Please contact your distributor for guidance and instructions for your choice of culture. Information about additional package sizes and sales units are also available upon request.

Liability

This information is to our knowledge trustworthy and presented in good faith. No guarantee against patent infringement is implied or inferred.



Istituto di Microbiologia - Centro Ricerche Biotecnologiche
Università Cattolica del Sacro Cuore
 via Emilia Parmense 84 29100, Piacenza, Italy

20th June 2007

Typing and fingerprint analysis of *Lactobacillus rhamnosus* strains

The strains *Lactobacillus rhamnosus* LRH08 and *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), provided by Sacco s.r.l., were first identified at species level by using a molecular taxonomy approach and then analyzed using two DNA based fingerprint techniques, the Rep-PCR and the RAPD.

Taxonomical identification

A sequence approach based on the analysis of the 5' region of the 6S rDNA was used to identify as species level the two strain LRH08 and GG (ATCC 53103). The two strains shows identical sequences on the 600 bp region at 5' end of 16 S rDNA. The sequence analysis demonstrated that the two strain belong to the taxonomical unit *Lactobacillus rhamnosus*.

Strain Typing

The two *Lactobacillus rhamnosus* LRR08 and *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) were compared by using two DNA based fingerprint techniques, the Rep-PCR and the RAPD.

The results of RAPD and REP-PCR analyses are shown in fig. 1 and 2.

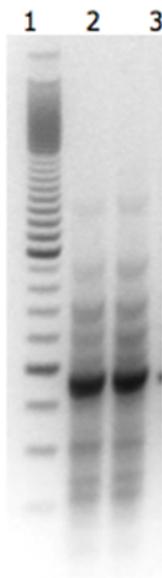


Fig. 1. RAPD analysis of *Lactobacillus rhamnosus* strains:

1. DNA molecular weight marker
2. *L. rhamnosus* LRH08
3. *L. rhamnosus* GG (ATCC53103)

Pier Sandro Cocconcelli

tel. +39.0523.599251 +39.0372.499119 fax +39.0523.599246 e-mail:
pier.cocconcelli@unicatt.it

1



Istituto di Microbiologia - Centro Ricerche Biotecnologiche
Università Cattolica del Sacro Cuore
via Emilia Parmense 84 29100, Piacenza, Italy

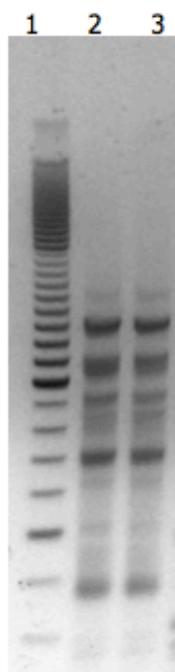


Fig. 2. REP-PCR analysis of *Lactobacillus rhamnosus* strains:

1. DNA molecular weight marker
2. *L. rhamnosus* LRH08
3. *L. rhamnosus* GG (ATCC53103)

The strain typing techniques RAPD and Rep PCR allowed to obtain DNA fingerprints of the *Lactobacillus rhamnosus* strains. The two *L. rhamnosus* cultures, *Lactobacillus rhamnosus* LRH08 and *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), present the same amplicon patterns, as shown in Fig. 1 and 2, indicating that they are the same strain.

Prof. Pier Sandro Coconcelli

Pier Sandro Coconcelli

tel. +39.0523.599251 +39.0372.499119 fax +39.0523.599246 e-mail:
pier.coconcelli@unicatt.it