



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

**“EFECTO DEL USO TÓPICO DEL PROBIÓTICO *LACTOBACILLUS
RHAMNOSUS SP1* EN UN MODELO DE CARIES *IN SITU*”**

María Paz Colil Orellana

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

**TUTOR PRINCIPAL
Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez**

**TUTORES ASOCIADOS
Dr. Rodrigo Cabello I.**

**Adscrito a Proyecto FIOUCH 17/015.
Santiago – Chile
2019.**



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

**“EFECTO DEL USO TÓPICO DEL PROBIÓTICO *LACTOBACILLUS
RHAMNOSUS SP1* EN UN MODELO DE CARIES *IN SITU*”**

María Paz Colil Orellana

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez

TUTORES ASOCIADOS

Dr. Rodrigo Cabello I.

**Adscrito a Proyecto FIOUCH 17/015.
Santiago – Chile
2019**

AGRADECIMIENTOS

A mi familia; Enrique, Ana María, Claudia y Carolina. Les agradezco todo el apoyo, cariño y amor que me dan. Le doy gracias a Dios por darme a personas tan maravillosas a mi lado, los amo mucho. Todo es gracias ustedes.

A la familia Colil y Orellana ; Norma, Hortensia , Juan , Rosa , Sonia , Felipe , Nelson , Ana , Catalina , Juan Guillermo , Claudio , Claudia , Diego , Daniela , Mariana . Gracias por su amor, su entrega, y por todo su apoyo durante toda mi vida universitaria.

A mis guías espirituales Tao y Luli, solo su presencia alegra mi existencia.

A mis amigos de la facultad, gracias por ser mi familia, y ser mi sostén en los momentos de desesperación y estrés. Fueron la fuerza y fuente de alegría durante mis 7 años en la facultad. Muchas gracias por su amistad.

A Angélica Araya, por ser mi amiga, mi consejera, mi hermana. Gracias por todo tu apoyo, por tus consejos y por estar a mi lado siempre. Te quiero mucho amiga.

A los docentes y funcionarios por guiarme durante mi carrera, tanto profesional como personal.

A los pacientes por su confianza y por creer en mis capacidades.

Al equipo del proyecto FIOUCH 17/015, al Dr. Rodríguez, por recibirme, apoyarme y guiarme durante esta última y significativa etapa de mi carrera.

A la Universidad de Chile, por ser la mejor.

Y a todos los que me acompañaron y compartieron conmigo este arduo camino.

Gracias ...

ÍNDICE

Resumen	6
1. Marco teórico	7
Caries dental y biopelícula dental	9
Proceso de desmineralización y remineralización	11
Probióticos	13
Modelos de caries	19
Planteamiento del problema	23
2. Hipótesis	24
3. Objetivo general	24
4. Objetivos específicos	24
5. Materiales y métodos	25
Diseño experimental	25
Diseño del dispositivo intraoral	26
Fase clínica de los grupos experimentales	28
Microdureza superficial de Vickers	29
Espesor del esmalte: Microtomografía computarizada (micro-CT) y Densidad Mineral	29
Morfología superficial: Microscopia electrónica de barrido	30
6. Resultados	32
Microdureza superficial de Vickers	32
Espesor del esmalte (micro CT) y densidad mineral	35
Morfología superficial: Microscopia electrónica de barrido	38
7. Discusión	40
8. Conclusiones	45
9. Referencias bibliográficas	46
10. Anexos	59

Resumen

Los probióticos han sido ampliamente estudiados por sus efectos positivos sobre la salud general. Sin embargo se ha investigado también el efecto que tienen en la cavidad oral, interactuando con el microbioma oral, contribuyendo así al equilibrio microbiano. El objetivo de este estudio fue determinar si existen diferencias en la microdureza superficial, morfología superficial y en el espesor de esmalte humano insertos en un modelo de caries *in situ*, luego de ser expuesto a *Lactobacillus rhamnosus* SP1 suministrado en formato tópico. 12 participantes sanos, de entre 18 y 30 años, sin lesiones de caries activas ni enfermedad periodontal, fueron asignados a dos grupos experimentales paralelos: el primer grupo fue expuesto a sacarosa (muestras sacarosa) y el segundo expuesto a sacarosa y probiótico (muestra S/P). El dispositivo intraoral superior que utilizaron consistía de tres plataformas acrílicas (una palatina y dos vestibulares) donde fueron insertados bloques de esmalte humano. La mitad de la superficie del bloque de esmalte palatino fue utilizada como control. Periodo experimental de 14 días. Se determinó la microdureza superficial de Vickers (MDV), morfología superficial del esmalte (por medio de microscopia electrónica de barrido) y el espesor del esmalte (al evaluar cambios en la densidad mineral según Micro-CT). Los resultados indicaron que, los promedios de microdureza presentaron una significativa diferencia ($p < 0,05$) entre los grupos de estudio, con valores más altos para los bloques de esmaltes expuestos a sacarosa y probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 por sobre aquellos expuestos exclusivamente a sacarosa (Media MDV Muestras S/P; $220,17 \pm 36,97$, Media MDV Muestra Sacarosa; $156,40 \pm 42,82$). Las imágenes obtenidas del microscopio electrónico de barrido de las muestras expuestas a sacarosa, revelan un esmalte más irregular y poroso en comparación con el esmalte expuesto a sacarosa y probiótico. Los resultados de densidad mineral; se observó una diferencia significativa entre el promedio de las muestras expuestas a sacarosa y probiótico ($2,37 \pm 10 \text{ gr/cm}^3$) por sobre muestras expuestas sacarosa ($1,93 \pm 09 \text{ gr/cm}^3$). Los resultados sugieren que la aplicación de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 de forma tópica sobre esmalte sometido a sacarosa, podría tener un efecto inhibitorio contra la desmineralización.

1. MARCO TEORICO

INTRODUCCIÓN

Según estudio realizado en el 2017, las enfermedades orales son altamente prevalentes en la población mundial, afectando aproximadamente 3,47 mil millones de personas en todo el mundo (GBD Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2017). Las caries no tratadas en dientes permanentes es la condición más prevalente evaluada según estudios realizados entre 1990 y 2010, con una prevalencia global del 35% para todas las edades combinadas, mientras que la periodontitis severa y las caries no tratadas en dientes temporales fueron en prevalencia la 6ª y 10ª condición, afectando respectivamente al 11% y 9% de la población mundial (Marcenes y cols, 2013).

Si tomamos en cuenta los aspectos científicos, clínicos y de salud pública de la caries, es importante apreciar el impacto que la enfermedad tiene en la calidad de vida de la personas en todo el mundo. La transición demográfica hacia el envejecimiento de las sociedades, demuestra que más personas mantienen sus dientes naturales en la vejez, provocando un cambio relativo en la carga de caries no tratadas en los adultos (Pitts N.B y cols, 2017a). En Chile estudios epidemiológicos indican una prevalencia de caries en niños de 2 años de 16,8 %, a los 4 años una prevalencia de 49,6 % y a los 6 años se ve un aumento con 70,4%. La caries dental es la principal causa de pérdida de dientes, donde su prevalencia aumenta sostenidamente con la edad, llegando casi al 100% en la población adulta. (MINSAL 2007, Ceballos M., Acevedo C. y cols., 2007).

La carga de caries dental en el mundo es importante, impactando en varios ámbitos de nuestra vida. La incomodidad que puede causar la progresión de la lesión de caries en los tejidos dentarios, a pesar de que esta condición no es peligrosa para la vida (Chen y Wang 2010), si trae importantes secuelas a la calidad de vida humana, con un alto impacto en el estado anímico de la persona que la padece, y un aumento en el costo monetario al tratar esta enfermedad. Por lo tanto, es imperativo buscar nuevos enfoques para enfrentar esta enfermedad,

suscitando un sistema más amplio de atención que promueva la salud y la prevención.

Avances relativamente recientes sobre el papel del microbioma oral en la salud y enfermedad, han proporcionado información sobre los diversos acontecimientos ecológicos, que actúan como conductores para cambiar el balance de la microbiota oral desde un estado simbiótico a disbiosis. La composición del microbioma oral es individualmente única y diversa (Kilian M. y cols, 2016), y una vez establecida, la microbiota oral residente es bastante estable y resistente a los elementos exógenos (Marsh PD., 2017). Esta estabilidad puede perderse cuando en el medio ambiente los factores de estrés anulan la resiliencia. Para las caries, los factores que conducen a la disbiosis están vinculados no solo a la producción de ácido bacteriano, sino también a otros productos biológicos y no biológicos; factores como la edad, la genética, el estilo de vida, el comportamiento, dieta y nivel socioeconómico entre otros (Twetman S., 2018a, Pitts NB y cols, 2017b).

Una característica importante de las biopelículas microbianas es su reducida sensibilidad a los agentes antimicrobianos, debido a una serie de factores que incluyen la falta de penetración de moléculas cargadas en la biopelícula y la inactivación del agente por organismos vecinos (Olsen I. 2015). Como una alternativa para manipular favorablemente la composición del microbioma oral están los probióticos (Marsh PD, 2018a). Los probióticos están regulados como aditivos que se incorporan a los alimentos, y los principales vehículos de administración son los productos lácteos, vegetales fermentados y masa fermentada como el pan. Igualmente en gotas, tabletas y pastillas que pueden contener varias cepas de *Lactobacilos* y/o *Bifidobacterias* (Twetman S., 2018b). Existe evidencia demostrada sobre el uso de terapias probiótica en enfermedades gastrointestinales, en la prevención de la gastroenteritis viral aguda, diarrea asociada al uso de antibióticos, ciertos trastornos alérgicos pediátricos, enterocolitis necrosante en recién nacidos prematuros, y enfermedades inflamatorias del intestino entre otras (Vuotto C. y cols. 2014). Aunque en la odontología aún faltan estudios que avalen el potencial anticariógeno de los

probióticos, la evidencia científica ha logrado demostrar que este tipo de terapia probiótica podría traer grandes beneficios a nuestra salud oral.

CARIES DENTAL Y BIOPELÍCULA DENTAL

Un concepto moderno de la enfermedad de caries define su etiología como una relación dinámica entre la microbiota residente y el hospedero, relación que puede ser perturbada por cambios en el estilo de vida o alteraciones en la biología de la boca; estos cambios pueden llevar a una disrupción del balance oral llevando a la iniciación y progresión de la caries dental (disbiosis) (Pitts N.B. y cols 2017c). En esta relación de mutua ayuda, el hospedero proporciona alimento, un hábitat, un pH predominante, y condiciones adecuadas para el crecimiento de una amplia gama de géneros microbianos. Y a cambio, la microbiota oral entrega algunas funciones claves que proporcionan importantes beneficios al hospedero; la microbiota oral residente actúa como una barrera para los organismos exógenos, desempeñando un papel inmunomodulador y regulador de respuestas potencialmente inflamatorias no deseadas (Marsh P.D., 2018b). Una vez establecidos en un sitio, la composición general de la microbiota puede permanecer relativamente estable con el tiempo (Marsh P.D y cols, 2011, Zhou Y. y cols 2013).

Los factores de riesgo de caries incluyen factores físicos, biológicos, ambientales, de comportamiento y relacionados con el estilo de vida, un flujo salival inadecuado, exposición insuficiente al fluoruro, mala higiene oral, métodos inadecuados de alimentación de los bebés y pobreza (Selwitz RH. y cols 2007). Sin embargo, la caries no se producirá en ausencia de una biopelícula dental cariogénica (patógena) y exposición frecuente a los carbohidratos de la dieta, principalmente azúcares libres (Kidd E.A. y Fejerskov, 2004a, Pitts N.B y cols, 2017d). Por lo tanto, la caries es consecuencia de un cambio desfavorable en el balance de la microbiota residente impulsado por cambios en el entorno dental y del hospedero.

La boca, como otras superficies del cuerpo, está colonizada por una gran variedad de microorganismos. El grupo más predominante son las bacterias, pero las levaduras, virus, micoplasmas y protozoos también pueden estar presentes. Es importante destacar la presencia de la saliva, que desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de esta microbiota beneficiosa conservando el entorno oral a un pH neutro (óptimo para el crecimiento y el metabolismo de la mayor parte de la microbiota oral), además de proporcionar proteínas y glicoproteínas como nutrientes (Devine, D.A y cols., 2015).

Como fue mencionado anteriormente, la microbiota oral tiene una relación simbiótica o mutualista con el hospedero, es decir, este último le proporciona un hábitat cálido y con los nutrientes suficientes para su supervivencia, y a cambio estos microorganismos fortalecen las defensas del hospedero al poner resistencia a los microorganismos exógenos. Pero la mínima variación en este equilibrio microorganismo-hospedero, puede desencadenar la enfermedad de caries. Trabajos basados en estudios de ADN y ARN de lesiones cariosas, han descubierto un ecosistema bacteriano extraordinariamente diverso, apoyando el concepto de que los consorcios, formados por los múltiples microorganismos que actúan colectivamente, probablemente de forma sinérgica en el inicio y progresión de la lesión de caries (Simon Soro y cols 2015a).

Según la teoría actual, la presencia de los microorganismos en la ecología bucal, se va estructurando a través de procesos de adaptación y selección inducidos por la acidificación del ambiente oral. Si las condiciones ácidas son más severas y prolongadas, las bacterias acidogénicas aumentan su potencial de producción de ácido como medida de adaptación al ambiente. En el caso de las bacterias acidúricas, estas se vuelven más dominantes a través de la selección inducida por ácido. Esta adaptación inducida por ácido microbiano (cambio fenotípico de la microbiota), así como la selección inducida por ácido (cambio genotípico de la microbiota) provocará un cambio en el potencial acidogénico total de la microbiota. Entre los microorganismos bacterianos, *Streptococcus mutans* (SM) y *Lactobacillus* son más competitivos bajo condiciones severamente ácidas (Takahashi y Nyvad, 2008a, 2011; Zhou Yan y cols., 2018). Estudios demostraron

que cuando el pH cae a un valor preestablecido de 5,0, *SM* y *Lactobacillus* predominaron, mientras que los *no-SM* y *Actinomyces* comenzaron a ser excluidos de la comunidad (Marsh PD. 1994a; Bradshaw y Marsh, 1998). Por lo tanto si la frecuencia de ingesta de carbohidratos fermentable en la dieta aumenta, la biopelícula pasaría más tiempo a un pH menor a 5,0 (Loesche, 1986). Consecuentemente, si la producción de ácido bacteriano aumenta, el equilibrio oral se inclinaría hacia la desmineralización de los tejidos duros dentarios por sobre la remineralización de la superficie dentaria (Takahashi y Nyvad, 2008b).

Así, el cambio de paradigma en la etiología de la caries dental debe traducirse en la búsqueda de terapias apropiadas y actualizadas. Dada la naturaleza polimicrobiana de la caries dental, usar estrategias diagnósticas y preventivas dirigidas hacia especies bacterianas específicas no será universalmente eficaz (Simon Soro y cols, 2015b). Asimismo, la investigación futura deberá tener como enfoque principal la restauración del balance microbiano-hospedero, obstaculizando el inicio y progresión de la enfermedad de caries, independientemente de los cuales sean los microorganismos bacterianos involucrados.

PROCESO DE DESMINERALIZACION Y REMINERALIZACION

La desmineralización inicial es el resultado de un proceso, donde la estructura mineral cristalina del diente es desmineralizado por ácidos orgánicos, que son producidos por las bacterias presentes en la biopelícula a través del metabolismo de carbohidratos fermentables de la dieta, principalmente azúcares (Bowen .H., 2002). Aunque una amplia gama de ácidos orgánicos pueden ser generados por los microorganismos de la biopelícula dental, el ácido láctico es el producto final predominante del metabolismo de los carbohidratos y se considera que es el principal ácido involucrado en la formación de caries (Takahashi N. y cols. ,2005).

Las bacterias presentes en la biopelícula, alteraran el pH bucal a través de los ácidos orgánicos que sintetizan (Paes Leme A.F.y cols 2006). A medida que los ácidos se acumulan en la fase fluida de la biopelícula, el pH cae al punto donde las condiciones del ambiente en la interfase biopelícula-esmalte se vuelve insaturado con respecto al cristal del esmalte en contacto con la biopelícula, por lo tanto, el ácido produce una desmineralización del mineral de la capa superficial del diente. Si el pH baja, se pierde mineral en la superficie dentaria o se gana en caso de un aumento de pH. La acumulación de estos procesos de re y desmineralizaciones puede llevar a una pérdida neta de mineral, dirigiendo la disolución de tejidos duros del diente y la formación de una lesión de caries (Kidd y Fejerskov, 2004b). La pérdida de mineral conduce a una mayor porosidad de los tejidos duros del diente, ampliando los espacios entre los cristales de esmalte ablandando la superficie, permitiendo que los ácidos difundan más profundo en el diente, resultando en la desmineralización del mineral debajo de la superficie (desmineralización subsuperficial). A medida que la desmineralización progresa hacia la subsuperficie del esmalte y dentina, con una continua presencia de ácido y caída del pH, la tasa de pérdida del mineral se vuelve mayor en la subsuperficie que en la superficie, lo que resulta en la formación de una lesión subsuperficial. Cuando la pérdida es severa aparece clínicamente la lesión como una mancha blanca. Esta es una etapa clínicamente importante del proceso de caries, ya que en esta etapa la lesión puede ser detenida o revertida modificando los factores causales; como cambios en la ecología local, la dieta y la disponibilidad de fluoruro. Estas lesiones pueden permanecer como están (lesiones inactivas que no progresan pero que siguen siendo reconocibles) como una cicatriz debido a los cambios en las propiedades ópticas del esmalte, o remineralizar y sanar de manera efectiva (reprecipitación del mineral en la lesión y posiblemente algún desgaste superficial) resultando en una superficie aparentemente sana, o permanecer activa y progresar a una destrucción más extensa (Pitt Nigel B.y cols, 2017d). Por lo tanto cuando el pH oral cae por debajo de 5,5 (se denomina pH crítico) la disolución del esmalte comienza. Este número varía de forma individual entre pacientes, por lo tanto es un valor promedio. Cuando el pH sube

nuevamente, por sobre 5,5, la remineralización ocurrirá (Lussi y cols, 2004, Sampaio de Melo M.A y cols, 2016).

Es importante equilibrar lo patológico y los factores de protección que influyen en el inicio y progresión de la caries dental. Promover los factores protectores de la remineralización y la detención de la lesión.

PROBIÓTICOS

La Organización Mundial de la Salud ha definido los probióticos como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedero" (OMS 2002). La característica de algunas bacterias intestinales para mantener o restablecer las condiciones de salud fue propuesta por primera vez por Elie Metchnikoff hace más de un siglo. Él observó que bacterias 'buenas', productoras de ácido láctico, particularmente aquellas que pertenecen a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, fueron beneficiosas para el hospedero al reducir el crecimiento de bacterias toxigénicas dentro del colon (Vuotto C.y cols , 2014). A través de los años, se ha estudiado el potencial de los probióticos en la formación de biopelículas en distintos tejidos del cuerpo. Investigaciones *in vitro* sobre adhesión, producción de bacteriocinas, coagregación, inhibición del crecimiento y la actividad metabólica han sugerido un gran potencial de los probióticos *Lactobacilli* y *Bifidobacteria*, modulando la ecología microbiana de las biopelículas, en particular, aquellas que se desarrollan a nivel oral, intestinal, vaginal y de heridas (Lebeer S.y cols, 2011). Los probióticos más comunes y estudiados son las cepas pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Especies de *Lactobacillus* de los cuales son considerados probióticos, son las cepas que incluyen a; *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, y *L. reuteri*. Las cepas de *Bifidobacterium* incluyen *B. bifidum*, *B. longum* y *B. infantis*.R (Meurman JH. y cols., 2007).

Un requisito esencial para que un microorganismo sea "un probiótico oral" es su capacidad de adherirse y colonizar superficies en la cavidad oral. Microorganismos en general considerados como probióticos pueden no tener la cavidad oral como su hábitat inherente, y su posibilidad de conferir beneficios a la salud oral es

cuestionable. Aunque se han encontrado cepas de *Lactobacillus* en la cavidad oral, como: *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus fermentum*, siendo este último el más prevalente (Koll y cols 2008a, Colloca ME. y cols ,2000). Estos hallazgos indican que las especies del género *Lactobacillus*, como miembros de la microbiota oral residente, podrían jugar un papel importante en el equilibrio microecológico de la cavidad oral; ya sea reduciendo el número de bacterias cariogénicas (especialmente *Streptococcus mutans*), su habilidad para coagregarse con las cepas asociadas a la caries y la capacidad de reducir la formación de biopelícula. (Lang C.y cols, 2010; Twetman L. y cols 2009).

Lactobacillus han sido estudiados por años, son conocidos por jugar un papel importante en el mantenimiento de la salud humana mediante la estimulación de la inmunidad natural y contribuir al equilibrio de la microbiota, principalmente a través de exclusión y actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas. Entre las cepas de *Lactobacillus*, *L. plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus salivarius*, y *Lactobacillus rhamnosus* son los que expresaron una alta actividad antimicrobiana y alta tolerancia al estrés ambiental de la cavidad oral (cambios en el pH). En estudios *in vitro* la mayoría de las cepas suprimieron el crecimiento de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Streptococcus mutans* (Simark-Mattsson y cols., 2007; Koll y cols., 2008 b, Xiaolong Lin y cols., 2017). Las cepas de *Lactobacillus* fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans* y tuvieron efectos en la composición de la biopelícula bacteriana *in vitro*, donde *L. rhamnosus* muestra el mayor potencial antagonista, interactuando con *S. mutans*, reduciendo su crecimiento e impidiendo la maduración de la biopelícula por la disminución en la producción de glucanos (Lee SH. y cols., 2014). Como ya fue mencionado, la adhesividad podría ser considerada de gran importancia, ya que favorece aún más la expresión de actividad probiótica. Estudios *in vitro* han evaluado la adhesión midiendo la unión de bacterias a la hidroxiapatita (HA) recubierta de saliva y al epitelio oral. Las cepas probióticas varían ampliamente su adhesividad a la HA revestida de saliva, siendo *L. rhamnosus* quien exhibió los valores más altos de adhesión (Stamatova I.y cols., 2009a). Otra de las características de

Lactobacillus, es la capacidad de estimular la inmunidad local (Meydani SN y cols., 2000) y modular la respuesta inmune, ya que expresan ligandos para receptores tipo toll (TLR)(receptores de señales de peligro tanto exógenas como endógenas) presentes en las células epiteliales, iniciando una respuesta inmune que permite el reconocimiento de la microbiota nativa y de patógenos exógenos (Stamatova I.y cols., 2009b). Por lo tanto, las bacterias probióticas protegen la salud oral compitiendo con los patógenos orales por nutrientes, factores de crecimiento y sitio de adhesión.

Se han propuesto varios conceptos para explicar la acción de los probióticos en la cavidad oral, pero la más acertada es la analogía realizada con los mecanismos de acción descritos para el intestino humano. Los probióticos promueven el crecimiento de bacterias beneficiosas de la microbiota intestinal y modulan la inmunidad intestinal (Saxelin et al. 2005). Los efectos beneficiosos que ejercen los probióticos a la salud intestinal; antagonizando patógenos a través de la producción de compuestos antimicrobianos (ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas), compitiendo por los sitios de unión a patógenos, los nutrientes disponibles, factores de crecimiento, y modulando la respuesta inmune y metabólica (Haukioja Anna , 2010). A nivel oral, la colonización y competición con los patógenos orales por los sitios de adhesión se consideran efectos beneficiosos de las bacterias probióticas en la salud oral. Por lo tanto, los probióticos pueden interactuar tanto de forma sinérgica como antagónica con las bacterias de la microbiota oral (Marsh PD. ,2004 , Lin TH. y cols, 2017).

Hay que tener en cuenta que todos los mecanismos descritos son basado en resultados *in vitro*, y la evidencia clínica se basa principalmente en estudios pilotos clínicos cortos (Haukioja Anna , 2010).

Mecanismos de acción directo de los probióticos al Interactuar en la placa dental (Haukioja Anna, 2010 , Patel y cols.,2015 ; Babaji y cols. 2012) :

- Participación en la unión de microorganismos orales a proteínas (formación de biopelículas).
- Acción sobre la formación de placas y sobre su complejo ecosistema compitiendo e interviniendo en la adhesión bacteriana.
- Compiten con los microorganismos orales por los sustratos disponibles.
- Producción de productos químicos que inhiben a las bacterias orales (sustancias antimicrobianas).

Acciones probióticas indirectas en la cavidad oral (Patel 2015, Babaji 2012):

- Modular el sistema inmune de la mucosa reduciendo la producción de citoquinas proinflamatorias inducida por patógenos.
- Afecta el mecanismo de defensa no inmunológico fortaleciendo la barrera mucosa, regulando la permeabilidad epitelial.
- Afectando la inmunidad local.
- Afecta la selección en la microbiota oral favoreciendo la colonización de especies menos patógenas.

El uso de cepas probióticas para la prevención de la caries dental ha dado resultados prometedores, aunque la mayoría de los estudios son *in vitro*, solo unos pocos estudios han demostrado resultados clínicos claros. Por lo tanto, la evidencia científica aún es pobre. Los estudios clínicos que se han llevado a cabo han usado distintas formas de administrar las cepas probióticas, siendo los productos lácteos los más utilizados, ya que constituyen un medio fácil de adoptar en la dieta diaria. Aunque otros autores han usado tabletas, pastillas, hasta helado como medio atractivo y cómodo de administración. Näse L. y cols. (2001a) utilizó leche como vehículo para el probiótico *Lactobacillus rhamnosus*, distinguiendo una reducción en el riesgo de caries en niños preescolares luego de un período de administración de 7 meses. La misma cepa, utilizada junto con *Lactobacillus casei*, disminuyó la colonización de *Streptococcus mutans* después del consumo de queso con probiótico por 3 semanas (Ahola y cols, 2002). Otras cepas de *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* han demostrado efectos beneficiosos similares utilizando como vehículo yogurt, leche o queso, que con un consumo

diario y regular condujo a una disminución en el número de *Streptococcus* cariogénicos en la saliva y una reducción en la formación de placa dental (Taipale y cols., 2012; Singh., 2011; Cildir y cols., 2009; Caglar y cols., 2008). Por lo tanto, la forma apropiada de administración de cepas probióticas se ha discutido en varios artículos, sin embargo, para fines de prevención o tratamiento de enfermedades orales, no se ha definido cuál es el medio más ventajoso.

Según la edad de intervención podemos agrupar algunos estudios: los estudios realizados durante la infancia, y los estudios realizados en niños preescolares. Durante la infancia podemos mencionar tres trabajos, en los cuales la intervención con probióticos fue realizada en los primeros años de vida de los voluntarios. El primer trabajo a examinar es el estudio de Stensson y cols (2014) , intervención realizada en infantes de 0 a 12 meses, a quienes se les dio gotas 5 veces al día que contenían dos cepas de *Lactobacillus reuteri* durante su primer año de vida . A los 9 años, el grupo de niños expuesto a los probióticos disminuyó en un 50 % su experiencia de caries en comparación con el grupo control. En el segundo estudio (Taipale y cols 2013) a los infantes se les dio tabletas con el probiótico *Bifidobacteria* desde los primeros meses de vida hasta los 2 años de edad con ayuda de un chupete específico. Las tabletas fueron endulzadas con xilitol y las tabletas que solo contenían xilitol o sorbitol sirvieron como control. Los voluntarios fueron examinados a los 4 años de edad, sin encontrar diferencias significativas en la ocurrencia de caries. El tercer estudio (Haslölöf y cols, 2013), utilizó cereal suplementado con el probiótico *Lactobacillus paracasei* F19 y cereal común como placebo en niños durante la ablactación (introducción de alimentos a la dieta). A la edad de 9 años, no hubo una diferencia significativa en experiencia de caries entre el grupo probiótico y el grupo control.

Las intervenciones realizadas en niños preescolares desde 1 a 6 años, podemos destacar algunos estudios; como el trabajo realizado por Rodríguez y cols (2016a), estudio que se llevó a cabo en jardines socialmente vulnerables en Chile, con niños que van desde los 2 a 3 años de edad. Utilizando leche como vehículo, suplementada con el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 y leche estándar

como control, con un consumo diario por 10 meses. A la examinación clínica, el número de individuos que desarrollaron nuevas lesiones de caries cavitadas (ICDAS 5- 6) fue significativamente más bajo en el grupo probiótico comparado con el grupo control. Otro trabajo a destacar es el de Näse y cols (2001), intervención realizada en niños de un centro de cuidado municipal en Finlandia. Como fue ya mencionado, se utilizó leche como vehículo para el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* (GG; LGG), suplemento ingerido 5 veces a la semana por 7 meses. El efecto del probiótico sobre el riesgo de caries fue positivo, aunque no estadísticamente significativo. El tercer estudio fue llevado a cabo en un grupo de niños de una comunidad de bajo nivel socioeconómico en Suecia (Stecksen-Blicks y cols, 2009). La intervención tuvo una duración de 1 año, en el cual el probiótico (tres cepas derivadas de *Streptococcus*) fue incorporado en pastillas, junto a un grupo de control (placebo). Al comparar los resultados de la intervención, se observa una significativa diferencia en la prevalencia de caries, con un 24 % en el grupo probiótico versus un 47 % de prevalencia de caries en el grupo placebo.

Consecuentemente la ingestión de probióticos puede ser un método prometedor en la prevención de caries, permitiendo abarcar simultáneamente a una gran población de alto riesgo cariogénico. Los datos preliminares obtenidos por las diversas investigaciones han sido alentadores, pero aún se necesitan numerosos estudios clínicos aleatorizados para establecer claramente el potencial de los probióticos en la prevención y el tratamiento de la caries dental. Quedan aún varios aspectos que deben ser esclarecidos, como el tipo de cepa usada en los estudios y el mecanismo de acción de los probióticos sobre el microbioma oral. Además como tópico importante de considerar en los futuros estudios clínicos, es la dependencia de la intervención a la cooperación de los sujetos y la elección de estos ya que los estudios mencionados anteriormente la mayoría fueron llevados a cabo en niños. Sin embargo, se necesita más investigación para explorar este nuevo enfoque preventivo en un contexto clínico.

MODELOS DE CARIES

En ciencia, necesitamos modelos que capturen elementos esenciales de una situación particular que se quiere estudiar. Tal modelo debe ser robusto, reproducible y confiable. Cada área de la ciencia tiene sus modelos para el estudio de los fenómenos. Así, las ciencias biomédicas se basan en diferentes modelos experimentales para poner a prueba las hipótesis: modelos *in vivo*, *in vitro* e *in situ* (Fina B. 2013a).

Los ensayos *in vivo* son aquellos en los cuales se realiza el estudio en las condiciones más próximas al fenómeno observado. La experimentación es realizada dentro o en el tejido de un organismo vivo. Por ejemplo un ensayo clínico.

Los estudios *in vitro*, son aquellos que intentan simular las condiciones naturales en que se realizó la observación, o aproximarse lo más posible a las condiciones aplicadas en los experimentos *in vivo*. Dichos experimentos son herramientas adecuadas para el estudio de mecanismos involucrados en los fenómenos observados. Sin embargo, un estudio *in vitro* muestra parcialmente el mecanismo en estudio. Las extrapolaciones que se hacen de un trabajo *in vitro* deben ser bien aclaradas en la discusión y en las conclusiones, a fin de evitar malas interpretaciones (Fina B. 2013b).

En odontología, los modelos *in vitro* han sido ideados para estudiar las interacciones entre la microbiota oral, el medio ambiente y el hospedero.

Los modelos de caries *in situ* implican el uso de aparatos u otros dispositivos que crean condiciones definidas en la boca humana, que simulan el proceso de caries dental u otros fenómenos, como la formación de biofilm. Los modelos *in situ* pueden servir como puentes entre los recursos naturales, la situación clínica (descontrolada) y la situación de laboratorio altamente controlado confiando en las propias bacterias del paciente para colonizar los especímenes. (Zero DT., 1995a).

Dada la naturaleza multifactorial de la caries dental, estos modelos deben incluir: un sustrato dental, ya sea esmalte o dentina; la formación o presencia de placa dental con potencial cariogénico; presencia de carbohidratos, ya sea controlado experimentalmente o provisto por el sujeto con su dieta normal; y tiempo, determinado por la duración del período experimental.

La principal ventaja de los modelos *in situ* es que son realizados en la boca humana, en contraste con los modelos de laboratorio *in vitro* o experimentación en animales. Además los estudios *in situ* facilitan el control de las variables experimentales y permiten una flexibilidad en el diseño experimental. Estos modelos facilitan la integración de varias técnicas analíticas científicas, aumentando así la sensibilidad y validez científica de la metodología. La desventaja es que debido a que se realiza en humanos, el número de sujetos que puede estar involucrado generalmente es más limitado, además que el estudio depende del cumplimiento por parte de los sujetos de prueba.

Los modelos *in situ* se han utilizado como herramienta desde hace años para el estudio de la caries dental. El primer trabajo realizado usando un modelo *in situ* fue Koulourides y Volker (1964) (Zero 1995b).

Los modelos *in situ* se han aplicado en el estudio de; mecanismos de acción del fluoruro (Koulourides y cols., 1974a; Koulourides y Housch., 1983) diferentes formulaciones de dentífricos con fluoruro (Schafer, 1989; Mellberg, 1991; Stephen y cols, 1992 : Amaechi y cols ., 2012) y sistemas de administración de fluoruro (Corpron y cols ., 1986 ; O'Reilly y Featherstone, 1987; Leach SA. Y cols., 1989) otros agentes remineralizantes (Featherstone y otros, 1982, Pearce y Nelson, 1988 ; Amaechi BT. y cols. , 2010.), factores de virulencia microbiana (Zeroy cols, 1986 ; Macpherson y cols, 1990), la cariogenicidad de los alimentos (Brudevold y cols, 1988; Kashket y otros, 1988; Wefel y Jensen, 1992) como también en el estudio de los efectos protectores de los productos lácteos (Silva et al, 1986; Reynolds, 1987; Featherstone y Zero, 1992) .

Los estudios *in situ* relacionados con la desmineralización de tejidos duros serán detallados bajo las siguientes características:

a) Características del sujeto.

Los sujetos deben ser bien caracterizados para permitir una interpretación adecuada de los datos generados. La siguiente es una lista de factores que deberían ser considerados en la selección del sujeto:

- Edad, sexo
- Estado de salud médico
- Antecedentes de exposición al fluoruro
- Factores de comportamiento
- Hábitos alimentarios
- Factores salivales

b) Diseño físico del modelo.

El diseño de un modelo *in situ* debe representar la complejidad del proceso de caries. La estructura física del modelo, la ubicación del sitio de prueba y el método de la formación de placa son parámetros que pueden ser utilizados por el investigador para ayudar a controlar la variación.

- Estructura física del modelo. Modelos intraorales: Los sistemas pueden ser fijos (cementados o unidos) o removibles.
- Ubicación del sitio de prueba: El área palatina, lingual, bucal, en los dientes y espacios edéntulos.

c) Tipo de sustrato de tejido duro:

La mayoría de los sistemas/modelos usan dientes humanos o dientes de bovino. El material dental puede ser preparado ya sea como bloques o como secciones individuales. La superficie del material puede ser natural , desgastada o pulida. El

esmalte sano se puede usar para medir la extensión de desmineralización neta que se produce en el modelo. Los dientes humanos deben considerarse el sustrato más adecuado para estudios *in situ*. La esterilización de los dientes puede ser por etileno, irradiación con óxido o gamma o por autoclave.

d) Método de evaluación del estado mineral:

Hay varios métodos para evaluar cambios que ocurren en la capa superficial externa del esmalte (Ten Bosch y Angmar-Mansson, 1991a; Arends y ten Bosch, 1992).

- Microradiografía transversa (TMR): es la técnica Gold estándar para cuantificar cambios en la cantidad y distribución mineral (Ten Bosch y Angmar-Mansson 1991b), sin embargo es una técnica destructiva que requiere la preparación de las muestras en secciones muy finas y una fuente de rayos X, por lo que no es necesariamente la primera opción para cuantificar cambios minerales.
- Microdureza superficial (SMH): ha sido ampliamente utilizada para estudiar la desmineralización y remineralización del esmalte en modelos de caries *in situ*. Todos estos estudios usaron una carga de 500 g para estudiar cambios bastante avanzados en el estado mineral de esmalte. La prueba de SMH es altamente sensible y reproducible para estudiar etapas muy tempranas de desmineralización *in situ* del esmalte (Zero y cols, 1992, 1994a) y remineralización del esmalte (Zero y cols, 1994b).
- Microscopía electrónica de barrido (MEB): Instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado. Permite estudiar en detalle la superficie y la estructura del esmalte dental, permitiendo hacer un mapeo tridimensional de la superficie con gran aumento.

- Micro CT: es una técnica efectiva y no destructiva para la medición del espesor del esmalte. Los sistemas de Micro-CT permiten generar rebanadas continuas del tejido para evaluar el espesor y el área del esmalte, dentina y cámara pulpar con precisión y fiabilidad. Además a través de un software se pueden analizar imágenes y realizar reconstrucciones 3D. (Swain V. 2009)

Planteamiento del problema

La enfermedad de caries se desencadena por la interacción a lo largo del tiempo entre microorganismos cariogénicos, una dieta rica en carbohidratos fermentables y factores del hospedero (Pitt Nigel B. y cols., 2017e). En la actualidad, la odontología está tomando un enfoque menos invasivo en el tratamiento de la enfermedad de caries, basándose en soluciones biológicas en lugar de un enfoque puramente restaurador. Se busca intervenir tempranamente enfocándose en la prevención y el control de la enfermedad oral.

Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, otorgan un beneficio en la salud del hospedero. Se ha demostrado su participación en la mantención de la salud oral. Estudios preliminares avalan la ingesta de probióticos a corto y largo plazo, trayendo como resultado la reducción del riesgo de caries entre los niños preescolares (Näse y cols. 2001b, Rodriguez G. y cols. 2016b). Los datos arrojados por investigaciones recientes sugieren que estos efectos positivos son resultados de las interacciones entre los probióticos y los microorganismos alojados en la cavidad oral del individuo (Jiang Qingru , 2016).

Existen datos de estudios *in vitro* y ensayos clínicos sobre la efectividad de los probióticos en la disminución en el riesgo de caries, pero aún faltan estudios *in situ* que nos permitan analizar; las vías de administración del probióticos más efectivas (administración tópica o sistémica), y cuantificar los efectos beneficiosos sobre la

salud oral. El propósito de este estudio es obtener mediciones confiables a través de un modelo *in situ*, en el cual un grupo de voluntarios sanos usarán un dispositivo intraoral, con insertos de esmalte dental humano que serán expuestos a sacarosa por 14 días. Los voluntarios deberán instilar probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 una vez al día en los bloques de esmalte, para luego del periodo de experimentación realizar los análisis de superficie del tejido utilizado.

La pregunta de investigación que se plantea es: ¿Existen diferencias en la microdureza superficial, en el espesor, y en la morfología superficial de bloques de esmalte humano insertos en un modelo de caries *in situ*, expuestos a sacarosa por 14 días, al instilar probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 en formato tópico?

2. HIPÓTESIS.

Existen diferencias en la microdureza superficial, en el espesor, y en la morfología superficial de bloques de esmalte humano insertos en un modelo *in situ*, expuestos a sacarosa y a la instilación de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 en formato tópico por 14 días.

3. OBJETIVO GENERAL.

Establecer si existen diferencias en la microdureza superficial, en el espesor, y en la morfología superficial de bloques de esmalte humano expuestos de sacarosa y a la instilación de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 en modalidad tópica en un modelo *in situ* de caries.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar microdureza superficial, densidad mineral y caracterización morfológica superficial de bloques de esmalte en un modelo *in situ* de caries, en un grupo sólo expuesto a sacarosa, un grupo expuesto a sacarosa y probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 en formato tópico, y un grupo control sin exposición.

- Comparar los resultados de microdureza superficial, espesor del esmalte y caracterización morfológica superficial en un modelo de caries *in situ* entre el grupo expuesto a sacarosa, el grupo expuesto a sacarosa y probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1, y un grupo control sin exposición.

5- MATERIALES Y METODOS

5.1 *Diseño experimental*

Estudio experimental *in situ*, realizado en una sola fase de 14 días de duración. Se reclutaron 12 voluntarios sanos sistémicamente entre 18 y 35 que participaron completando previamente una anamnesis dental integral (Anexo 1). Los voluntarios contaron con una buena salud oral, con más de 22 piezas dentarias naturales en boca, libres de enfermedad periodontal y gingival, índice COPD menor a 8, libres de lesiones de caries sin tratar (C=0) y tasa de flujo salival normal.

Criterios de exclusión: fumadores, individuos que se hayan sometido a tratamientos antibióticos o antisépticos bucales en un plazo de seis meses previos a la fecha de ingreso al estudio, que presentasen alteraciones en el flujo salival, signos de periodontitis destructiva o signos inflamatorios, consumo de fármacos y/o con intolerancia a los materiales de estudio (acrílico), embarazo.

Aspectos éticos

Este proyecto se rigió por los principios de la Declaración de Helsinki, y cuenta con la aprobación del comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (ACTA N°2016/30)(Anexo 2).

Se solicitó la firma de un documento de consentimiento informado (Anexo 3) a los voluntarios de manera que su participación fuera voluntaria e informada. El documento detalla el propósito del estudio, su duración, procedimientos requeridos, posibles riesgos y el contacto del equipo investigador.

Construcción de la muestra

Para el cálculo del tamaño de muestra, se decidió que el tamaño de muestra que se ajusta mejor al modelo, se lograba cuando se utilizaba la medición de microdureza superficial. Se consideró un riesgo *alfa* de 0,05 y un riesgo *beta* de 0,2 en un contraste bilateral. Se asume que la desviación estándar común de 15,3 (Salehzadeh E y cols., 2105), con una tasa de pérdidas de seguimiento del 5%, y un poder estadístico de 80 %. Se precisan 18 unidades de observación en cada grupo para detectar una diferencia igual o superior a 15 unidades de microdureza Vickers. El número final de unidades de observación por grupo fue de 90.

Los voluntarios fueron distribuidos en los grupos de experimentación de forma aleatoria, se realizó la instalación y alivio del dispositivo.

5.2 - Diseño del dispositivo intraoral

Los voluntarios usaron un dispositivo intraoral acrílico removible (Figura 1) (Koulourides T. y cols., 1974, Featherstone IDB. y Zero DT., 1992), con dos plataformas de acrílico ubicados en la zona vestibular de los molares superiores, y una plataforma acrílica en la zona anterior del paladar. Estas dieron sostén a los bloques de esmalte procesados, extraídos de dientes humanos incluidos. Para la obtención de los bloques, se utilizaron terceros molares incluidos sin contacto con el medio oral con indicación de extracción, que fueron donados por pacientes que consintieron voluntariamente (Anexo 3). Los molares se mantuvieron en solución de Timol al 0,2%, pH 7, por un mes como máximo (Cury JA y cols., 1997). Los bloques fueron cortados con un disco de diamante sinterizado, con las medidas de 3x3 mm (bloques vestibulares) y de 3x6 mm (bloque palatino) dejando una superficie lisa. Luego, fueron sometidos a autoclave por 20 min a 120°C, para asegurar su esterilización. El dispositivo consto de 4 ranuras de 4x4 mm ubicadas en la zona vestibular de los molares, y 2 ranuras por lado donde estaban insertos lo bloques de esmalte de 3x3 mm. En la zona palatina sólo de ubica una ranura de 4 x7 mm, donde va introducido el bloque de esmalte de 3 x 6 mm (Figura 1).

Los bloques de esmalte fueron montados individualmente usando cera adhesiva de alta fusión. Los bloques de esmalte a su alrededor, poseían un espacio de 1

mm de separación con el acrílico para favorecer la acumulación de placa (Cury y cols., 1997) en las zonas vestibulares de molares.

En las muestras ubicadas en la zona palatina, la mitad derecha de la muestra de 3x6mm fueron revestidas con esmalte de uña transparente, usando esta superficie como un control (grupo de muestras control).



Figura 1. Dispositivo intraoral

5.3 Fase clínica de los grupos experimentales

Cada voluntario utilizó un dispositivo intraoral durante 14 días. La elección de los sujetos y su distribución en los grupos experimentales fue aleatoria. Los voluntarios fueron divididos en dos grupos de 6 personas cada uno; un grupo expuesto a sacarosa y el segundo grupo expuesto a sacarosa y probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1. Ambos grupos debieron instilar 1 gota (0,067ml) de sacarosa al 20% (Aires y cols., 2006), que corresponde a 0,013 gramos de sacarosa, a cada una de las muestras ubicadas en palatino y vestibular como desafío cariogénico (5 gotas en total por aplicación). La aplicación fue cada 2 horas hasta lograr 8 aplicaciones diarias (Cury y cols., 1997). La aplicación fue realizada mediante un gotario fuera de boca.

El grupo expuesto al probiótico aplicó sacarosa al 20 % 8 veces al día cada 2 horas, más la aplicación diaria del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* cepa SP1 (Sacco, Italia) con una concentración estándar de 10^8 UFC/ml. La instilación fue de 1 gota (0,083 ml) que corresponde a $8,3 \times 10^6$ UFC/ml del probiótico. La aplicación se realizó una vez al día junto a la segunda instilación de sacarosa y se aplicó una gota de probiótico a todas las muestras del dispositivo. Esta se llevó a cabo a través de un gotario fuera de boca y luego de la aplicación el dispositivo se introducía a la boca inmediatamente (Figura 2).

Las instrucciones de uso del dispositivo y la forma de aplicación de los tratamientos fueron entregadas de forma oral y escrita a los participantes (Anexo 5). El dispositivo intraoral fue usado día y noche, durante 14 días continuos, sólo podía ser retirado durante los momentos de higiene oral y alimentación, además de la aplicación de los tratamientos tópicos indicados. El dispositivo solo podía permanecer fuera de boca, dentro de un contenedor plástico con humedad (gasa o papel húmedo), por un tiempo máximo de 30 minutos sólo 3 veces al día.

La evaluación del compromiso y cumplimiento por parte de los voluntarios se realizó mediante una pauta escrita en la cual, a conciencia, detallaron el desempeño individual en cuanto a la aplicación de la sacarosa y/o probiótico, el uso y comodidad del dispositivo (Anexo 6).

5.4 Microdureza superficial de Vickers (MDV)

Posterior a los 14 días de uso del dispositivo, se midió la microdureza superficial en cada bloque de prueba utilizando una indentación de diamante de Vickers (Duramin , Struers Corp.), con una carga de 200 g (1,961 N) aplicados durante 10 segundos. Las muescas fueron hechas en el centro y en el extremo superior e inferior de la superficie del bloque de esmalte. Las muestras de esmalte fueron hidratadas en timol al 0,2 % mínimo por 2 días. Se aseguro cada bloque de esmalte con un cuadrado de cera amarilla de 1x1 cm² y luego se montó en la plataforma del microdurómetro para la medición de microdureza. Se realizaron cinco mediciones por superficies, obteniendo un promedio de dureza por cada bloque de esmalte. Los valores de dureza fueron calculados por el equipo utilizando la siguiente formula:

$$\text{Microdureza Vickers (VH)} = 1,854 \times F \times 10^{-3} / d^2.$$

HV: microdureza de vickers

F: test de carga aplicada (N)

d : promedio de las diagonales de la indentación (Majithia U . y cols, 2016)

5.5 Espesor del esmalte: Microtomografía computarizada (micro-CT) y Densidad Mineral

Las distribuciones de densidad mineral de los bloques de esmalte, después de la aplicación de sacarosa al 20 % y la instilación diaria de probiótico *Lactobacillus rhamnosus SP1*, se caracterizó utilizando el sistema de tomografía microcomputada de escritorio de alta resolución (Skyscan 1278 , Aartselaar, Bélgica) ubicado en la facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Con una aceleración de Voltaje de 100 kV, una fuente de corriente de 100 μ A, y un tiempo de exposición de 885. La calibración del nivel de gris fue logrado utilizando el esmalte de las muestras control como guía para determinar los valores de densidad mineral (DM) de diferentes partes del diente.

Las muestras fueron rotadas en 360°, generando 1440 proyecciones de sombras bidimensionales, con una matriz de imágenes de 352 píxeles x 352 píxeles. Las imágenes se guardaron como un archivo de imagen con formato 16 bits Tagged

Image File Format (TIFF) y luego fueron exportadas a un programa para la reconstrucción tomográfica 3D (NRecon software, Versión: 1.7.4.2; SkyScan). La reconstrucción tomográfica proporcionó un conjunto de imágenes con diferentes cortes en formato 16 bits TIFF.

El análisis de la densidad mineral fue realizado en el programa CT Analyser (Version: 1.18.4.0). Para calcular la densidad mineral (DM) de cada región, se realizó un trazado seleccionando sólo el esmalte del bloque, y los valores de DM de todos los píxeles de la región se midieron y promediaron. Se realizaron 3 trazados por muestra, y los valores finales fueron promediados.

5.6 Morfología superficial: Microscopía electrónica de Barrido

El microscopio electrónico de barrido, marca Jeol Modelo JSM IT300LV, con potencial de aceleración de 5 a 30 KV, provisto de una cámara digital y con distintos poderes de magnificación. Se encuentra ubicado en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Las muestras fueron fijadas con glutaldehído al 2,5 % y en buffer cacodilato de sodio 0,1 M por 2 horas, luego fueron lavadas 3 veces por 5 minutos y secadas por aproximadamente 30 minutos (AUTOSAMDRI-815, SERIES A OVERVIEW). Una vez secas las muestras, fueron montadas en un portamuestras de aluminio para posteriormente ser metalizadas en oro (METALIZADOR DENTON VACUMN). Cada muestra fue expuesta a aumentos de 30X, 250X, 1500X. La observación se fijó en el plano transversal del bloque de esmalte, y se fue aumentando las magnificaciones con el fin de observar los cambios morfológicos en la superficie de cada muestra.

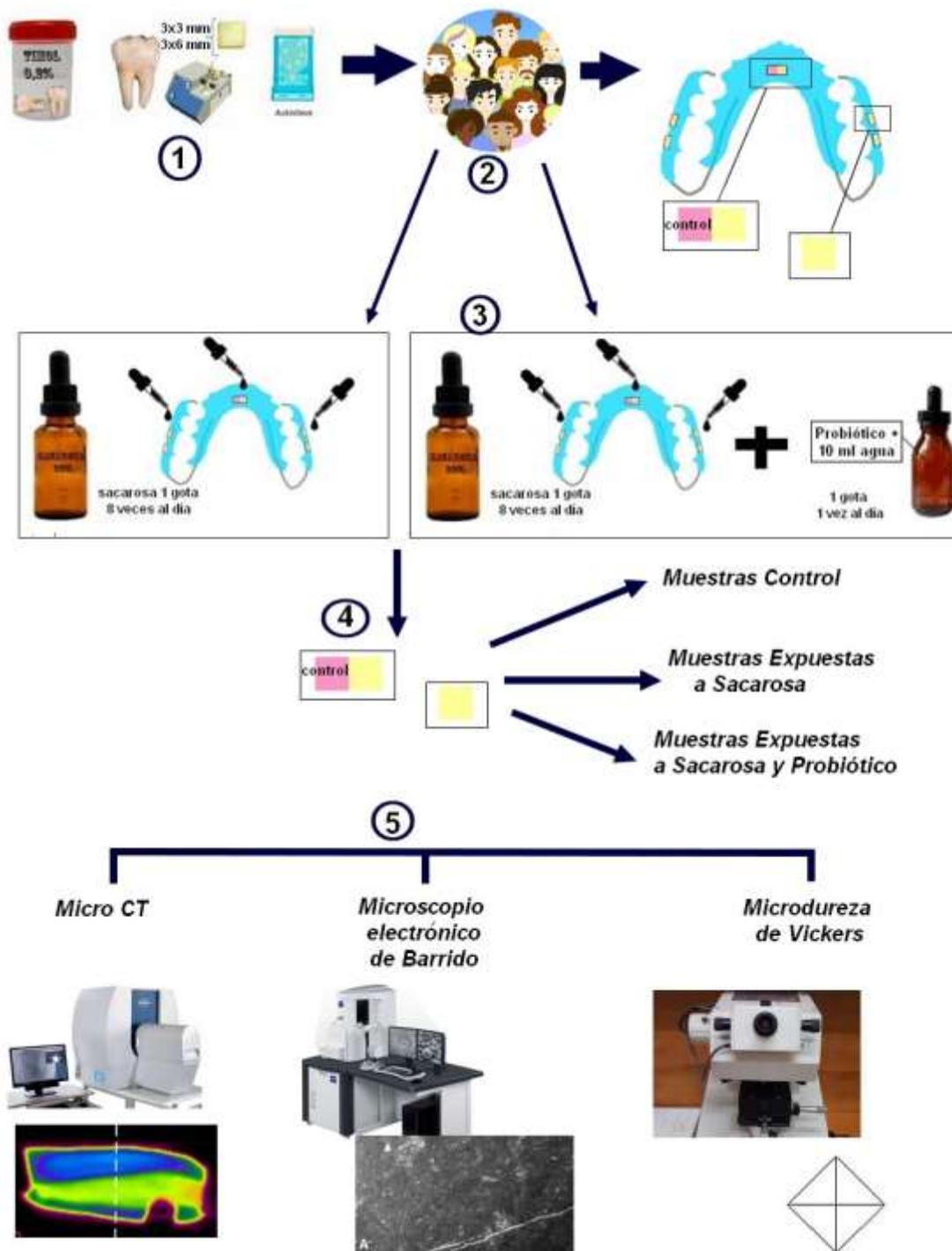


Figura 2 - (1) Recolección , recorte y esterilización de esmalte humano (2) Voluntarios y confección de dispositivos (3) Asignación al azar de los voluntarios en los grupos experimentales y fase intraoral (4) Remoción y separación de las muestras (5) Análisis de las muestras en MicroCT , microscopía electrónica de barrido y microdureza de Vickers.

5.7 Análisis Estadístico

Los datos fueron codificados e ingresados a una base de datos por un solo operador en archivo Excel Office para Windows. Luego se traspasaron al programa T Test (Student's T-Test) para ser sometidos a análisis estadístico. Se desarrolló un análisis descriptivo de los datos de microdureza y densidad mineral de las muestras pertenecientes a cada grupo experimental. Se realizó una comparación de los datos entre los grupos de muestras control–probiótico, y sacarosa–probiótico. Las variables cuantitativas 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.

6.- RESULTADOS

De los 12 voluntarios reclutados para el estudio, sólo 10 completaron el procedimiento. No hubo pérdida de muestras (bloques de esmalte). Las muestras fueron separadas según el grupo experimental; muestras expuestas a sacarosa , muestras expuestas a sacarosa y probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 y muestras control . A las muestras palatinas le fue removido el esmalte de uña correspondiente a la superficie control y fueron hidratadas en timol al 0,2%. Las muestras palatinas fueron analizadas por superficie; superficie control (no expuesta) y superficie expuesta. Esta última fue incorporada a los grupos experimentales correspondientes. Las muestras fueron removidas de su respectivo dispositivo y testeadas por diferentes pruebas.

6.1 Microdureza superficial de Vickers (MDV): La dureza de las superficies de los bloques de esmalte se midió utilizando un indentador de diamante Vickers en un probador de microdureza estándar. Los resultados de microdureza son representados en la Figura 3. Se observa los promedios, las desviaciones estándar e intervalo de confianza de los valores para el grupo de muestras control, el grupo de muestras tratadas con sacarosa y probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 y el grupo de muestras expuestas sólo a sacarosa. Los valores promedios difieren entre los 3 grupos de muestras (Grupo muestras Control; $296,10 \pm 38,68$

MDV, Grupo muestras S/P; $220,17 \pm 36,97$ MDV, Grupo muestras Sacarosa; $156,40 \pm 42,82$ MDV) (Figura 3).

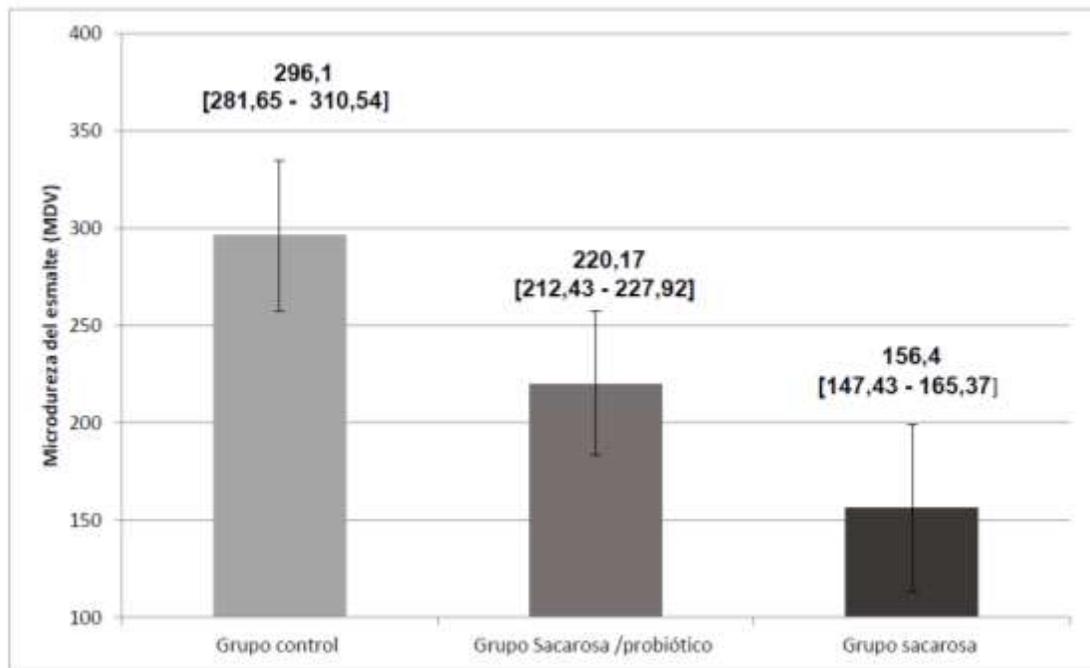


Figura 3: Gráfico con los valores promedios para cada grupo de muestras; Grupo de muestras control, grupo de muestras expuestas a sacarosa /probiótico (S/P) y grupo de muestras expuestas a sacarosa. Los valores sobre las barras corresponden al promedio y entre corchetes el intervalo de confianza.

El grupo de muestras control presenta los valores más altos de dureza superficial del esmalte, seguido del grupo expuesto a sacarosa/probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1. Al analizar y comparar los promedios para cada grupo de muestras, se observa una diferencia significativa entre el grupo de muestra control y el grupo de muestras expuesto a sacarosa / probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 ($P < 0,05$) utilizando T-Test. El grupo de muestras expuesta a sacarosa comparado con el grupo expuesto a sacarosa /probiótico, muestra una diferencia significativa ($P < 0,05$) en sus valores promedios de microdureza (Tabla 1). Los datos de microdureza correspondientes a las muestras palatinas (Tabla 2) describen un promedio de 292,8 MDV para la superficie control y 209,6 MDV para la superficie expuesta a sacarosa y probiótico, revelando una diferencia significativa entre ambas superficies.

Tabla 1: Análisis descriptivo muestra la comparación intergrupala del promedio de diferencia y significación (*P*) de la microdureza de las muestras de esmalte entre los grupos control y experimentales.

Comparación entre grupos de muestras expuestas	Promedio diferencia microdureza del esmalte (MDV)	Valor de <i>P</i>
Control vs Sacarosa /Probiótico	75,92	<i>P</i> < 0,05
Sacarosa vs Sacarosa/Probiótico	63,77	<i>P</i> < 0,05

Tabla 2 : Análisis descriptivo muestra los valores de microdureza superficial de muestras palatinas; datos de la superficie control y de la superficie expuesta a Sacarosa/ Probiótico . Valor de la diferencia de microdureza de las muestras de esmalte entre ambas superficies. ****P* < 0.05**

Muestras palatinas por superficies	Promedio microdureza del esmalte (MDV) ± desviación estandar	Intervalo de confianza
Control	292,8 ± 50,13	265,03 - 320,56
Expuesta a Sacarosa/Probiótico	209,6 ± 32,16	191,7 - 227,41
Diferencia entre superficies	83,2 ± 69,52*	44,69 - 121,70

6.2 Espesor del esmalte (micro-CT) y Densidad Mineral

Análisis cualitativo del espesor del esmalte: Las imágenes de micro-CT fueron seleccionadas, destacando los cuadros de las muestras palatinas. Se escogieron las muestras más representativas, que nos permitieron comparar ambas zonas del bloque de esmalte palatino (superficie control y superficie expuesta a Sacarosa/Probiótico) (Figura 4). Se utilizó un código de colores para caracterizar al esmalte desde un corte axial. La codificación con colores, representa mapas de densidad mineral normalizada, que muestran la distribución y los niveles de densidad mineral dentro de las áreas de la lesión y el esmalte sano. La observación y el análisis de las muestras palatinas fue realizado de forma separada: por superficie expuesta y superficie no expuesta (control). Se puede observar en la imagen de la muestra palatina representativa, en la superficie de las muestras, un área de desmineralización en la zona expuesta (área izquierda) comparado con el área control (área derecha), que no muestra mayores alteraciones en su espesor.

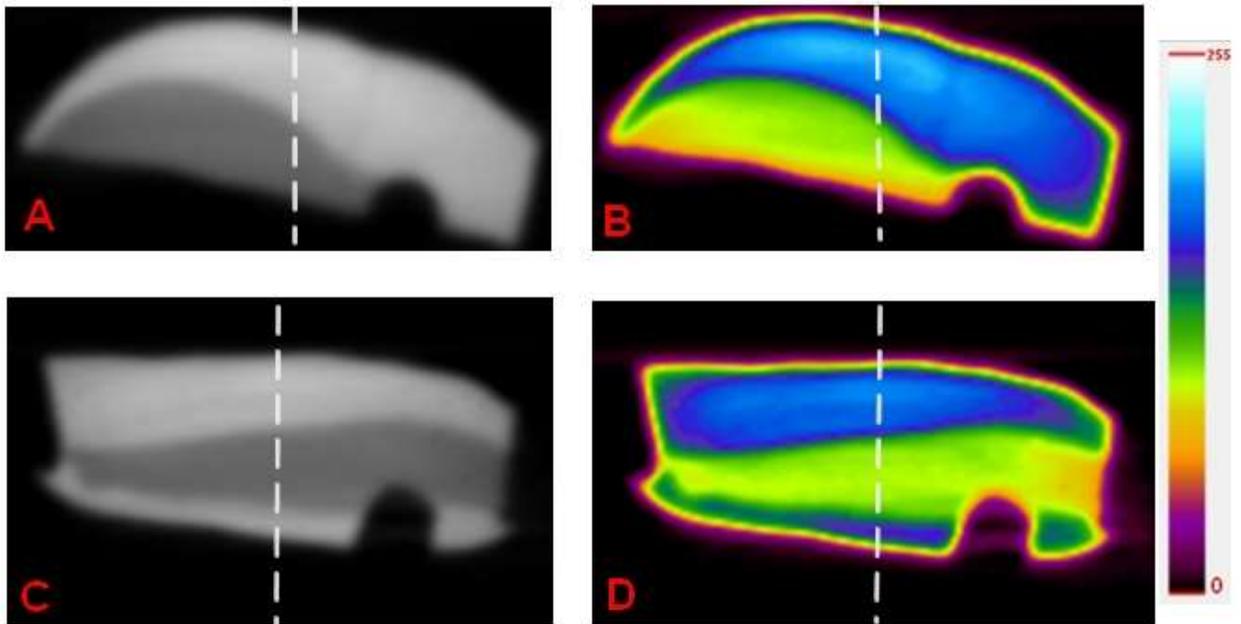


Figura 4 : (A-B) (C-D) Imágenes de micro-TC de dos muestras palatinas después de 14 días de ser sometidas a sacarosa y probiótico tópico. Las áreas separadas con la línea blanca representan la superficie expuesta (izquierda) y la superficie no expuesta como control (derecha). (B) (D) imágenes de micro-TC codificadas en color representando las muestras anteriores. Se observa en la superficie externa izquierda de las muestras una zona más oscura (en la imagen a color se representa como una zona violeta) que sugiere un área de desmineralización.

Cuantificación de la densidad mineral: Con respecto a la evaluación de la densidad mineral de las muestras, se ve una diferencia en los valores promedios de los grupos de muestras. La densidad mineral en las muestras que fueron sometidas a sacarosa/probiótico ($2,37 \pm 0,10 \text{ gr/cm}^3$) tuvo un promedio menor comparado con los resultados dados para el grupo de muestras control (Tabla 3) con un promedio de $2,47 \text{ gr/cm}^3$ para este último. El promedio para las muestras sometidas a sacarosa fue el valor más bajo de los tres, con un promedio de $1,93 \text{ gr/cm}^3$. Al comparar el grupo de muestras control con las expuestas a sacarosa y probiótico se observa una diferencia significativa entre sus promedios de densidad mineral (Tabla 4). Se advierte una diferencia significativa entre los valores promedio de las muestras expuestas a sacarosa y las muestras expuestas a sacarosa/probiótico (Tabla 4).

Tabla 3: análisis descriptivo del promedio, desviación estándar e intervalo de confianza de la densidad mineral de los grupos de muestras palatinas: superficie control, expuestas a sacarosa /probiótico y expuestas a sacarosa.

Grupo de muestras expuestas	Promedio densidad mineral del esmalte (gr/cm.) \pm desviación estándar	Intervalo de confianza
Sacarosa	1,93 \pm 0,9	1,88 - 1,98
Sacarosa /Probiótico	2,37 \pm 0,1	2,32 - 2,42
Control	2,47 \pm 0,74	2,43 - 2,51

Tabla 4: Análisis descriptivo muestra la comparación intergrupar del promedio de diferencia y significación (P) de la densidad mineral de las muestras palatinas de esmalte entre los grupos control y experimentales.

Comparación entre grupos de muestras expuestas	Promedio diferencia de densidad mineral (gr/cm ³)	Valor de P
Control vs Sacarosa /Probiótico	0,099	$P < 0,05$
Sacarosa vs Sacarosa/Probiótico	0,437	$P < 0,05$

6.3 Morfología superficial: microscopia electrónica de barrido: Las muestras expuestas al microscopio electrónico de barrido fueron analizadas en relación a los cambios morfológicos observados en la superficie del esmalte. Se realizó una selección de las micrografías más representativas de los grupos de muestras y se realizó su comparación según la morfología y características de la superficie. Se puede observar en la Figura 5, en la primera fila una micrografía de una muestra del grupo control (A-B). La segunda fila (C-D), muestra de grupo expuesto a sacarosa que presenta una superficie más porosa, irregular, con mayor pérdida mineral en comparación en la imagen del grupo expuesto a sacarosa y probiótico (E-F) en la que se observa un esmalte más liso, con menor pérdida de cristales del esmalte .

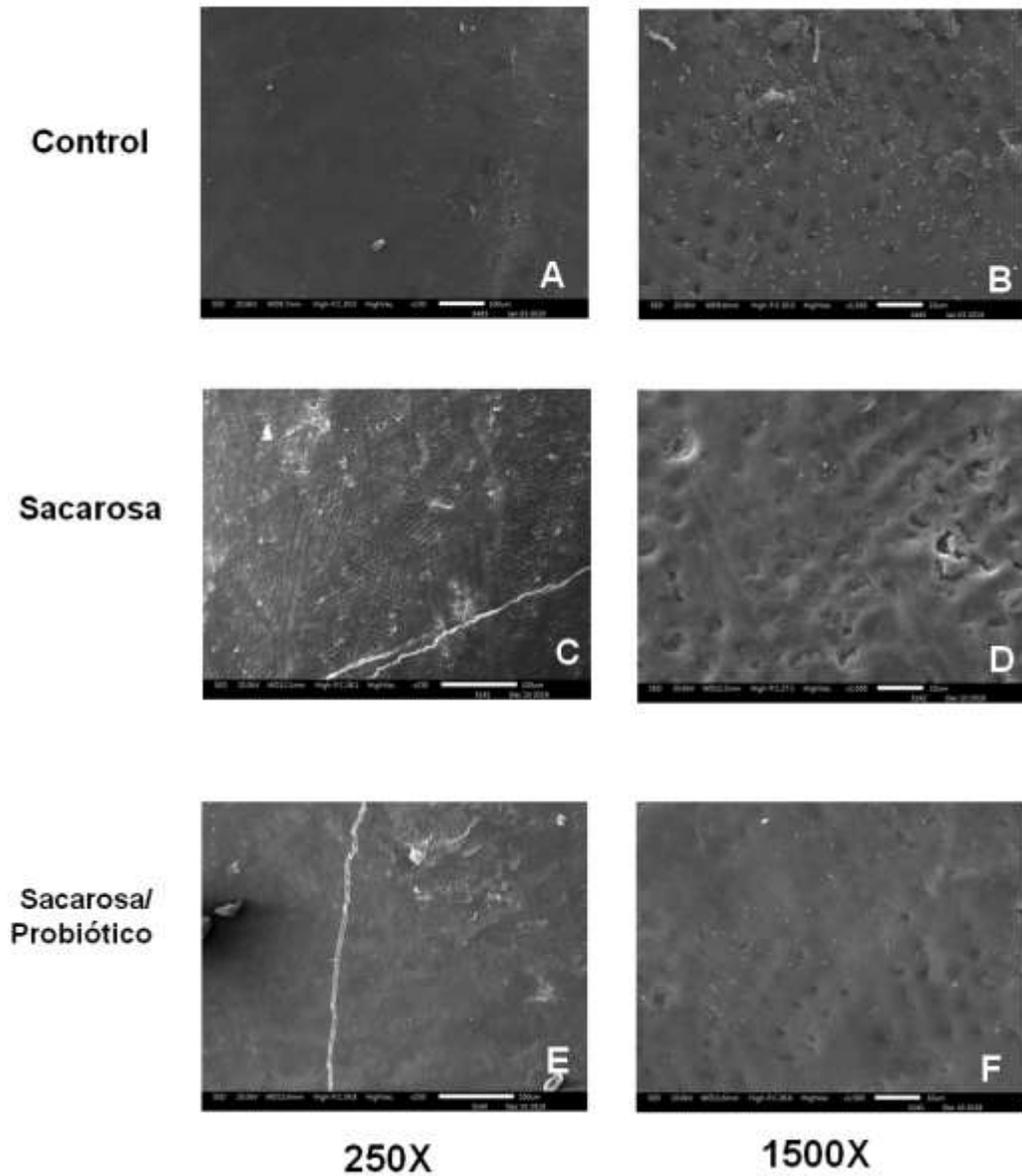


Figura 5: Foto SEM de superficie de los bloques de esmalte. A-B corresponden a una muestra de esmalte control con una magnificación de 250X (A) y de 1500X (B). C-D corresponden a una muestra de esmalte expuesta solo a sacarosa por 14 días con una magnificación de 250X (C) y de 1500X (D). E-F fotos de muestra expuesta a sacarosa y probiótico por 14 días con la misma magnificación que las muestras anteriores.

7- DISCUSIÓN

En este estudio *in situ*, se expuso a un grupo de voluntarios al probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 por 14 días en un formato de aplicación tópico. Las muestras de esmalte dental integradas en un dispositivo intraoral, fueron observadas por diferentes pruebas para probar el efecto de los probióticos sobre los bloques de esmalte. La medición de la microdureza superficial del esmalte proporciona una importante y objetiva información sobre la desmineralización de la estructura dental, como indicador de presencia de caries (Featherstone JDy cols, 1983, Gutiérrez M. P. y. Reyes G., 2001). Los resultados de microdureza de la superficie del esmalte indicaron que el tratamiento tópico con *Lactobacillus rhamnosus* SP1 produjo una protección contra la desmineralización. La diferencia significativa se observó entre los promedios de las muestras expuestas a sacarosa y las muestras del grupo expuesto a sacarosa/probiótico. Sin embargo, al comparar la microdureza entre el grupo control y el grupo expuesto a sacarosa/probiótico, existe una diferencia significativa que nos advierte que esta protección dada por los probióticos no logra inhibir la desmineralización de forma completa. El valor promedio de microdureza de las muestras control ($296,10 \pm 38,68$ MDV) fue similar a los resultados del estudio *in vitro* de Wongkhanteea S. y cols(2006), pero más bajo que los valores reportados en Mettu S. y cols (2015).

Para la evaluación del espesor del esmalte se utilizó Micro-TC, que permite caracterizar la densidad mineral y los cambios estructurales de la lesión sin necesidad de seccionamiento o preparación de la muestra (Shahmoradi M y cols , 2017). Los resultados de densidad mineral muestran el mismo patrón que los datos dados para microdureza; se observa un mayor valor para el grupo de muestras control ($2,475 \text{ gr/cm}^3$), seguidas del grupo de muestras expuestas a sacarosa y probiótico ($2,37 \text{ gr/cm}^3$), y el grupo de muestras expuestas a sacarosa ($1,93 \text{ gr/cm}^3$) con el valor más bajo. Los valores de densidad mineral para el grupo control son similares a los obtenidos en el estudio de Shahmoradi M. y cols (2017). Estos hallazgos sugieren un efecto protector de los probióticos en el esmalte, previniendo la pérdida de su integridad estructural y mecánica, pero al igual que los resultados de microdureza este efecto protector no logra prevenir la

desmineralización del esmalte en su totalidad. No existen estudios previos de probióticos *in situ* con que comparar los resultados obtenidos, pero si podemos considerar a futuro la densidad mineral como una herramienta que nos permite cuantificar los cambios en el volumen del esmalte.

Este es el primer informe comparando el esmalte desmineralizado y el esmalte expuesto a probiótico utilizando microscopio electrónico de barrido. La superficie de esmalte expuesta a sacarosa y probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 por 14 días, muestra una rugosidad menor que la expuesta sólo a sacarosa. El análisis de las imágenes del microscopio electrónico de barrido confirmaron los resultados de la microdureza, ya que de los valores de microdureza disminuyeron gradualmente entre los diferentes grupos, lo que reveló una superficie de esmalte para el grupo expuesto a sacarosa más blando y poroso en comparación con los otros grupos.

Los modelos *in situ* tienen el potencial de servir de puentes entre la situación clínica natural descontrolada y la situación altamente controlada de laboratorio, para combinar la versatilidad y alto nivel de control de los modelos de laboratorio con mayor relevancia clínica en menor tiempo y menor variabilidad con respecto a los ensayos clínicos (Zero DT., 1995). Los modelos intraorales se han utilizado en varios estudios de caries dental, desmineralización y remineralización pero muy pocos han indagado en el potencial de los probióticos. Este estudio representa un nuevo informe sobre el comportamiento de los probióticos en un modelo humano *in situ*, que ha demostrado una significativa efectividad en la inhibición de la desmineralización del esmalte.

Estudios clínicos previos apoyan la efectividad de los probióticos en la prevención y tratamiento de enfermedades de la cavidad bucal. Se ha visto efectos positivos sobre enfermedades orales prevalentes como lo son la Periodontitis, Gingivitis, Candidiasis oral y caries dental (Seminario-Amez M. y cols,2017). Ensayos clínicos han estudiado y probado los efectos de los probiótico sobre la caries dental (Ahola y cols, 2002 Taipale y cols., 2012; Singh., 2011 ; Cildir y cols., 2009 ; Caglar y cols., 2008 Hasslof y cols, 2013). ; Näse y cols

(2001c) utilizando *Lactobacillus rhamnosus* GG en niños de 1 a 6 años, observa una disminución en el riesgo de caries. Rodríguez y cols en el 2016, realizó una intervención en niños de 2-3 años, socialmente vulnerables. Utilizando *Lactobacillus rhamnosus* SP1 como probiótico observo una disminución en el desarrollo de lesiones de caries cavitadas (ICDAS 5-6) en el grupo tratado con el probiótico.

En la actualidad existe muy pocos reportes que han utilizado un modelo de caries *in situ* para probar el efecto de los probióticos; Simonetti C. y cols (2015) realizó un estudio *in situ* con 10 voluntarios, utilizando un dispositivo oral con bloques de esmalte bovino. Se utilizó sacarosa como desafío cariogénico y dos tipos de leches fermentadas suplementadas con probióticos. Los probióticos utilizados fueron *Lactobacillus casei* (leche 1), *Lactobacillus acidophilus*, *bifidobacterium sp* y *Lactobacillus paracasei* (leche 2), mostrando una diferencia significativa en microdureza del esmalte comparado con la microdureza inicial. Los valores promedios de microdureza del esmalte expuesto a probióticos superan los valores dados para el esmalte expuesto a sacarosa, pero cabe enfatizar que las cepas de probiótico y el vehículo usados en dicho artículo no son los mismos a los manejados en este.

La selección de las mejores cepas probióticas para la prevención de las enfermedades orales sigue siendo un problema abierto. Se han llevado a cabo estudios *in vitro* verificando la eficacia y atributos de los probióticos; reducida producción de ácido, sin riesgo de cariogenicidad, sin potencial de resistencia a los antibióticos, y sin parámetros generales tóxicos (Bosch M. y cols 2012). Sin embargo no se ha llegado a un consenso que permita establecer que cepa probiótica tiene el mayor potencial para intervenir en pro del equilibrio oral, o el vehículo más conveniente para llevar a cabo la intervención.

Los mecanismos de acción de los probióticos sobre la formación de la placa dentaria y la caries dental no están dilucidados completamente. Se ha visto una competencia de estas bacterias con los patógenos orales por nutrientes, factores

de crecimiento y sitio de adhesión. (Twetman S., 2012). Estudios *in vitro* han planteado que las bacterias probióticas se adhieren a los tejidos orales más fuertemente que los patógenos, pudiendo competir por las superficies de adhesión (Piwat S. y cols ., 2012) , pero aún no está claro los mecanismos exactos por el cual los probióticos confieren beneficios positivos a la cavidad oral y a otras partes del cuerpo humano .

En particular, las modificaciones al modelo intraoral de Koulourides (T. Koulourides , 1974) ha llevado al desarrollo de un modelo de caries *in situ* con suficiente sensibilidad y reproducibilidad , respondiendo a diferentes procesos y dosis que permiten validar el modelo (Parkinson C.R. y cols ., 2018) . Los beneficios que trae el uso de un modelo *in situ* de caries es la reproducción y simulación de las condiciones intraorales no controladas, incorporando parámetros experimentales altamente controlados. Así como beneficios, también existen ciertas importantes limitaciones a considerar al utilizar este modelo, que deben ser manejadas cuidadosamente por los investigadores; el reclutamiento de voluntarios es un periodo de ardua búsqueda, que podría llegar a retrasar el proyecto en su totalidad. Una forma de combatir esta situación sería la incorporación de más muestras al dispositivo intraoral. Otro aspecto a considerar es el compromiso de parte de los voluntarios, que debe ser vigilado estrictamente por los investigadores, insistiendo en el cumplimiento del protocolo y los períodos de experimentación. La incomodidad del utilizar el dispositivo es un factor importante a considerar en lo que respecta al cumplimiento del protocolo, situación que se podría enmendar acortando los tiempos de experimentación, o realizando pruebas previas para que los voluntarios se acostumbren a su uso. A nivel del diseño del dispositivo intraoral, la recolección de dientes para obtener las muestras de esmalte puede ser muchas veces una difícil labor, por lo que la opción de utilizar esmalte bovino debe ser considerada. El tamaño de las muestras fueron de 3x3 mm y 3x6 mm, por lo que si no están bien incorporadas a los dispositivos, estas se podrían desprender pudiendo lastimar al voluntario y alterar el tamaño de muestras. Por lo tanto, para llevar a cabo un estudio *in situ*, se requiere de una minuciosa organización de parte de su equipo de trabajo y una

buena comunicación con el grupo de voluntarios para finalizar la experimentación con éxito.

Este estudio nos otorga evidencia de los beneficios de los probióticos en forma tópica, en la inhibición de la desmineralización en un modelo *in situ*, pero esta protección no logra impedir la desmineralización en su totalidad. Esta condición puede ser explicada por el hecho de que la dosis óptima requerida para la supresión bacteriana patógena no se utilizó, o el número de dosis diarias debe ser mayor, o la vía de administración no es la más efectiva. Se necesitan más estudios microbiológicos e inmunológicos que permitan esclarecer estos y otros temas pendientes que deben ser trabajados en un futuro; como son determinar el mecanismo de acción de los probióticos en el ambiente oral, las cepas probióticas óptimas, la concentración de probióticos y las dosis diarias efectivas, la vía de administración (ya sea tópica, sistémica o mixta) y vehículos a utilizar. Con esta información justificada, se podrán llevar a cabo estudios más certeros que avalen el verdadero potencial de los probióticos como una herramienta para prevenir y combatir las enfermedades orales.

Los resultados sugieren que la aplicación de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 de forma tópica en esmalte sometido a sacarosa, tiene un efecto inhibitorio sobre la desmineralización.

8- CONCLUSIONES

- Se demostró que existen diferencias significativas en el espesor y microdureza superficial del esmalte expuesto a sacarosa y probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 tópico, versus el esmalte expuesto sólo a sacarosa.
- Al comparar el esmalte expuesto a sacarosa y probiótico, comparado con el expuesto sólo a sacarosa, se logra observar en las imágenes una superficie de esmalte menos porosa e irregular .

9 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

Aires CP, Tabchoury CP, Del Bel Cury A, Koo H, Cury JA. (2006) Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed in situ and on enamel demineralization. *Caries Res.* 40(1):28-32.

Amaechi BT, Karthikeyan R, Mensinkai PK Najibfard K, Mackey AC, Karlinsey RL (2010);. Remineralization of eroded enamel by a NaF rinse containing a novel calcium phosphate agent in an in situ model: A pilot study. *Clin Cos Invest Dent* 2:93-100.

Amaechi B.T., BDS, MS, PhD n K. Ramalingam, MSc, MPhil, PhD n P.K. Mensinkai, DDS, MS n I. Chedjieu, BDS, MPH (2012) .In situ remineralization of early caries by a new high-fluoride dentifrice . *General Dentistry* 186-192 .

Arends J, ten Bosch JJ (1992). Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res* 71(Spec1ss):924-928.

Babaji P, Keswani K, Lau H, Lau M, Sharma N, Punga R.(2012) Role of probiotics in oral health: A review of the literature. *J. Educ. Ethics. Dent.*;2:52-5.

Bosch M, Nart J, Audivert S, Bonachera MA, Alemany AS, Fuentes MC, et al. (2012) Isolation and characterization of probiotic strains for improving oral health. *Arch Oral Biol.*; 57: 539–549. doi: 10.1016/j.

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

Bowen WH. (2002) Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium?. *Crit Rev Oral Biol Med.* Mar;13(2):126-31.

British Society of Periodontology. (2016). Revised Basic Periodontal Exam Guidelines. [http://www.bsperio.org.uk/publications/downloads/94_154250_bpe-2016-po-v5-final_002.pdf]

Bradshaw DJ, Marsh PD (1998). Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities in vitro. *Caries Res* 32:456-462.

Brudevold F, Goulet D, Attarzadeh F, Tehrani A (1988). Demineralization potential of different concentrations of gelatinized wheat starch. *Caries Res* 22:204-209.

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, 154–158.

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

Chen F, Wang D (2010) Novel technologies for the prevention and treatment of dental caries: a patent survey. *Expert Opin Ther Pat* 20(5): 681–694. <https://doi.org/10.1517/13543771003720491>

Cildir, S.K.; Germec, D.; Sandalli, N.; Ozdemir, F.I.; Arun, T.; Twetman, S.; Caglar, E. (2009) Reduction of salivary mutans streptococci in orthodontic patients during daily consumption of yoghurt containing probiotic bacteria. *Eur. J. Orthod.*, 31, 407–411.

Colloca ME, Ahumada MC, Lo'pez ME, Nader-Maci'as ME. (2000) Surface properties of lactobacilli isolated from healthy subjects. Oral Dis: 6: 227–233.

Corpron RE, Clark JW, Tsai A, More FG, Merrill DF, Kowalski CJ, et al. (1986). Intraoral effects of a fluoride releasing device on acid-softened enamel. J Am Dent Assoc 113:383- 388.

Cury J.A , B. Rebello MA, Dei Bel Cury A. A.(1997). In situ Relationship between Sucrose Exposure and the Composition of Dental Plaque . Caries Res 31:356-360.

Devine, D.A., Marsh, P.D. y Meade, J. (2015). Modulation of host responses by oral commensal bacteria. J. Oral Microbiol. 7, 26941

Fejerskov O (1997). Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. Community Dent Oral Epidemiol 25:5-12.

Featherstone JDB, Cutress TW, Rodgers BE, Dennison PJ (1982). Remineralization of artificial caries-like lesions in vivo by a self-administered mouthrinse or paste. Caries Res 16:235-242

Featherstone JD, ten Cate JM, Shariati M, Arends J(1983). Comparison of artificial caries like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. Caries Res;17:385-91.

Featherstone IDB, Zero DT. (1992): An in situ model for simultaneous assessment of inhibition of demineralization and enhancement of remineralization. 1 Dent Res 71:804- 810.

Fina B., Lombarte M., Rigalli A.(2013) Investigación de un fenómeno natural: ¿estudios in vivo, in vitro o in silico?. Actual. Osteol ; 9(3): 239-240. Internet: <http://www.osteologia.org.ar>

GBD Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators (2017) Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 . Lancet 2018; 392: 1789–858 . Vol 392 November 10, 2018

Gutiérrez-Salazar M. P. and J. Reyes-Gasga (2001) Enamelhardness and caries susceptibility in human teeth, Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales, Vol. 21, N° 2, 36-40.

Jiang et al. (2016) Interactions between *Lactobacillus rhamnosus* GG and oral micro-organisms in an in vitro biofilm model. BMC Microbiology 16:149

Kashket S, Brudevold F, Yaskell T, Makonnen M (1988). Increased permeability of enamel to iodide ions following the ingestion of cookies varying in sucrose or fat content. Caries Res 22:193-198.

Kilian M, Chapple il, hannig m, marsh pd, meuric v, pedersen am, tonetti ms, wade wg, zaura E (2016) . The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. Br Dent J; 221: 657–666..

Kidd E.A.M. y Fejerskov O. (2004a,b) What Constitutes Dental Caries? Histopathology of Carious Enamel and Dentin Related to the Action of Cariogenic Biofilms . J Dent Res 83(Spec Iss C):C35-C38

Koll P, Mandar R, Marcotte H, Leibur E, Mikelsaar M, Hammarstrom L. (2008 a , b). Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. Oral Microbiol Immunol: 23: 139–147.

Koulourides T, Phantumvanit P, Munksgaard EC, Housch T(1974). An intra-oral model used for studies of fluoride incorporation in enamel. *J Oral Pathol* 3:185-196.

Koulourides T, Housch T (1983). Hardness testing and microradiography of enamel in relation to intraoral deand remineralization. In: *Demineralization and remineralization of the teeth*. Leach SA, Edgar WM, editors. Oxford: IRL Press, pp. 255-272.

Hasslöf P, West CE, Videhult FK, Brandelius C, Stecksén-Blicks C. 2013. Early intervention with probiotic *Lactobacillus paracasei* F19 has no longterm effect on caries experience. *Caries Res.* 47(6):559–565.

Haukioja Anne (2010) Probiotics and oral health. *Eur J Dent* 4(3):348–355

Lang C, Boottner M, Holz C et al. (2010) .Specific *Lactobacillus/Mutans Streptococcus* coaggregation. *J Dent Res*; 89(2): 175–179.

Lebeer S, Verhoeven TL, Claes IJ et al. FISH (2011) Analysis of *Lactobacillus* biofilms in the gastrointestinal tract of different hosts. *Lett Appl Microbiol*; 52(3): 220–226.

Lee Sung-Hoon , Kim Young-Jae .(2014) A comparative study of the effect of probiotics on cariogenic biofilm model for preventing dental caries. *Arch Microbiol* 196:601–609

Loesche Walter j. (1986) Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay. *Microbiological Reviews*, p. 353-380

Lin X. y cols .(2017) Effect of probiotic lactobacilli on the growth of *Streptococcus mutans* and Multispecies Biofilms Isolated from Children with Active Caries . *Med Sci Monit.*; 23: 4175-4181

Lin Tzu-Hsing , Chih-Hui Lin¹ , Tzu-Ming Pan (2018) . The implication of probiotics in the prevention of dental caries. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102:577–586

Lussi, Adrian & Jaeggi, T & Zero, Domenick. (2004). The Role of Diet in the Aetiology of Dental Erosion. *Caries research*. 38 Suppl 1. 34-44. 10.1159/000074360.

Majithia U, Venkataraghavan K, Choudhary P, Trivedi K, Shah S, Virda M. (2016)- Comparative evaluation of application of different fluoride varnishes on artificial early enamel lesion: An in vitro study. *Indian J Dent Res*;27:521-7

Marcenes, Kassebaum , E. Bernabé, A. Flaxman, M. Naghavi, A. Lopez, y C.J.L. Murray (2013). Global Burden of Oral Conditions in 1990-2010: A Systematic Analysis. *J Dent Res* 92(7):592-597

Macpherson LMD, MacFarlane TW, Stephen KW (1990). An intra-oral appliance study of the plaque microbiota associated with early enamel demineralization. / *Dent Res* 69:1712-1716.

Marsh P.D .(1994). Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 8:263-271.

Marsh PD (2004) Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 38(3): 204–211

Marsh PD, Moter A, Devine DA. (2011). Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol* 2000 55: 16–35.

Marsh PD. (2017)Ecological events in oral health and disease: New opportunities for prevention and disease control? *J Calif Dent Assoc*; 45: 525–537.)

Marsh P.D.(2018a , b). In *Sickness and in Health—What Does the Oral Microbiome Mean to Us? An Ecological Perspective*. *Advances in Dental Research* , Vol. 29(1) 60– 65

Magalhães A.C , B.M. Moron a L.P. Comar a A. Wiegand b W. Buchalla b M.A.R. Buzalaf (2009). Comparison of Cross-Sectional Hardness and Transverse Microradiography of Artificial Carious Enamel Lesions Induced by Different Demineralising Solutions and Gels . *Caries Res*;43:474–483

Mahdi Shahmoradi,¹ Neil Hunter,² and Michael Swain¹ (2017) .Efficacy of Fluoride Varnishes with Added Calcium Phosphate in the Protection of the Structural and Mechanical Properties of Enamel. *BioMed Research International* Volume, Article ID 7834905, 7 pages <https://doi.org/10.1155/2017/7834905>

Mettu S, Srinivas N, Reddy Sampath CH, Srinivas N. (2015) .Effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (cpp-acp) on caries-like lesions in terms of time and nano-hardness: An in vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*;33:269-73.

Mellberg JR, Blake-Haskins J, Petrou ID, Grote NE (1991). Remineralization and demineralization in situ from a triclosan/co-polymer/fluoride dentifrice. *J Dent Res* 70:1441-1443.

Meurman JH, Stamatova (2007). Probiotics: contributions to oral health. *Oral Diseases* (2007) 13, 443–451

Meydani SN, Ha WK. (2000). Immunologic effects of yoghurt. *Am J Clin Nutr*;71:861-872

MINSAL. (2010). Análisis de la Situación de Salud Bucal. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile.

Näse, L.; Hatakka, K.; Savilahti, E.; Saxelin, M.; Pönkä, A.; Poussa, T.; Korpela, R.; Meurman, J.H. (2001 a,b). 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, 412–420.

Paes Leme A.F., Koo H., Bellato C.M., Bedi G., and Cury J.A. (2006) .The Role of Sucrose in Cariogenic Dental Biofilm Formation—New Insight. J Dent Res. October ; 85(10): 878–887.

Panich M, Poolthong S.(2009) The effect of Casein Phosphopeptide- Amorphous Calcium Phosphate and a cola drink on in vitro enamel hardness. J Am Dent Assoc;140:455-60.

Piwat S, Sophatha B, Teanpaisan R. (2015)An assessment of adhesion, aggregation and surface charges of Lactobacillus strains derived from the human oral cavity. LettApplMicrobiol.;61:98-105.

Podolsky S. (1998) . Cultural divergence: Elie Metchnikoff's Bacillus bulgaricus therapy and his underlying concept of health. Bull Hist Med; 72(1): 1–27.

Olsen I. (2015). Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 34(5):877–886.

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

O'Reilly MM, Featherstone JDB (1987). Demineralization and remineralization around orthodontic appliances: an in vivo study. Am J Orthod Dentofac Orthop 92:33-40.

Panich M, Poolthong S.(2009) The effect of Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate and a cola drink on *in vitro* enamel hardness. J Am Dent Assoc;140:455-60.

Patel AB, Patel AB, Patel BV. (2015). Probiotics and its Implication in Oral Health. *Int J Oral Health Med Res*;2(3):100-104.

Pearce EIF, Nelson DGA (1988). In vivo comparison of caries inhibition by a plaque mineral enriching mouthrinse and a fluoride dentifrice. *Caries Res* 22:362-370.

Peterson Scott N. et al . (2014) . Functional Expression of Dental Plaque Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Volume 4 /Article108

Pitts, NB, Zero, DT, Marsh, PD et al. (2017 a,b ,c, d) . Dental caries . *Nature Reviews Disease Primers*, 3. 17030. p. 17030

Reynolds EC (1987). The prevention of sub-surface demineralization of bovine enamel and changes in plaque composition by casein in an intra-oral model. *J Dent Res* 66:1120-1127.

Rodríguez G. et al.(2016 a,b) . Probiotic Compared with Standard Milk for High-caries Children: A Cluster Randomized Trial . *Journal of Dental Research* 1–6 .

Sampaio de Melo M.A , Passos V. , Marques Lima P. , Lima Santiago , Lidiany KarlaAzevedo Rodrigue (2016) Carbohydrate-electrolyte drinks exhibit risks for human enamel surface loss . ISSN 2234-7658 (print) / ISSN 2234-7666 (online)

Salehzadeh Esfahani K, Mazaheri R, Pischevar L.(2015) Effects of Treatment with Various Remineralizing Agents on the Microhardness of Demineralized Enamel Surface. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*.9(4):239-245

Saxelin M, Tynkkynen S, Mattila-Sandholm T, de Vos WM (2005) .Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr Opin Biotechnol* 16(2):204–211.

Selwitz, R.H.; Ismail, A.I.; Pitts, N.B. (2007) Dental caries. *Lancet*, 369, 51–59.

Seminario-Amez M, López-López J, Estrugo-Devesa A, Ayuso-Montero R, Jané-Salas E. (2017) . Probiotics and oral health: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. May 1;22 (3):e282-8.

Schafer F (1989). Evaluation of the anti-caries benefit of fluoride toothpastes using an enamel insert model. *Caries Res* 23:81-86.

Silva MF de A, Jenkins GN, Burgess RC, Sandham HJ (1986). Effects of cheese on experimental caries in human subjects. *Caries Res* 20:263-269.

Simark-Mattsson C, Emilson C-G, Grahn Ha°kansson E, 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: 308–314.

Simon-Soro A , Mira A. (2015 a,b) .Solving the etiology of dental caries .*Trends in Microbiology*, Vol. 23, No. 2

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, 389–394.

Stephen KW, Damato FA, Strang R (1992). An in situ enamel section model for assessment of enamel re/demineralization potential. *J Dent Res* 71 (Spec Iss):856-859.

Stamatova I, Kari K, Vladimirov S, Meurman JH. (2009 a,b). In vitro evaluation of yoghurt starter lactobacilli and *Lactobacillus rhamnosus* GG adhesion to saliva-coated surfaces. *Oral Microbiol Immunol*: 24: 218–223.

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 pre-school children: a cluster-randomized study. *Caries Res.* 43(5):374–381.

Stensson M, Koch G, Coric S, et al. (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(2):111-7.

Suryakant C Deogade (2015) Probiotics: Contributions to Oral and Dental Health . Article in Oral health and dental management . OHDM- Vol. 14- No.3-June

Swain Michael V., Xue Jing ,(2009) State of the Art of Micro-CT Applications in Dental Research . *Int J Oral Sci*, 1(4): 177–188.

Taipale, T.; Pienihäkkinen, K.; Salminen, S.; Jokela, J.; Söderling, E. (2012). *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 administration in early childhood: A randomized clinical trial of effects on oral colonization by mutans streptococci and the probiotic. *Caries Res.*, 46, 69–77.

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(5):364–372.

Takahashi N. , Nyvad B. (2011) The Role of Bacteria in the Caries Process: Ecological Perspectives . *J Dent Res* 90(3):294-303, 2011

Takahashi N, Nyvad B (2008). Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res* 42:409-418.

Takahashi, N. (2005). Microbial ecosystem in the oral cavity: metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. *Int. Congr. Ser.* 1284, 103–112

Ten Bosch JJ, Angmar-Mansson B (1991). A review of quantitative methods for studies of mineral content of intra-oral incipient caries lesions. *J Dent Res* 70:2-14.

Twetman L, Larsen U, Fiehn NE et al. (2009 a ,b). Coaggregation between probiotic bacteria and caries-associated strains: an in vitro study. *Acta Odontol Scand*; 67(5): 284–288.

Twetman S. (2018) . Prevention of dental caries as a non-communicable disease. *Eur J Oral Sci*; 126(Suppl. 1): 19–25. © 2018 Eur J Oral Sci

Twetman Svante (2012) Are we ready for caries prevention through bacteriotherapy? *Braz Oral Res.*, (São Paulo) ;26(Spec Iss 1):64-70

Vuotto C. , Longo F. , Donelli G. (2014) .Probiotics to counteract biofilm-associated infections:promising and conflicting data . *International Journal of Oral Science* 6, 189–194

Wefel JS, Jensen ME (1992). An intra-oral single-section demineralization/remineralization model. *J Dent Res* 71(SpecIss):860-863.

World Health Organization (WHO). (1995). Guidelines for good clinical practice (GCP) for trials on pharmaceutical products. WHO Technical Report Series. N° 850, Annex 3.

World Health Organization (WHO). (1997). Encuestas de Salud Bucodental: Métodos básicos. 4ed. Ginebra

Wongkhanteea,b, V. Patanapiradejb , C. Maneenutb , D. Tantbirojnb,c, (2006) Effect of acidic food and drinks on surface hardness of enamel, dentine, and tooth-coloured filling materials . *Journal of Dentistry* 34, 214–220

Zhou Y, Gao H, Mihindukulasuriya KA, La Rosa PS, Wylie KM, Vishnivetskaya T et al. (2013). Biogeography of the ecosystems of the healthy human body. *Genome Biol* 14: R1.

Zhou Y, Millhouse E, Shaw T, Lappin DF, Rajendran R, Bagg J, Lin H and Ramage G (2018) Evaluating *Streptococcus mutans* Strain Dependent Characteristics in a Polymicrobial Biofilm Community *Front. Microbiol.* 9:1498. doi: 10.3389

Zero DT, van Houte J, Russo J (1986). The intra-oral effect on enamel demineralization of extracellular matrix material synthesized from sucrose by *Streptococcus mutans*. *J Dent Res* 65:918-923.

Zero DT, Fu J, Anne KM, Cassata S, McCornack SM, Gwinner LM.(1992) : An improved intra-oral enamel demineralization test model for the study of dental caries. *J Dent Res*; 71 : 871-878.

Zero D, Featherstone JDB, Fu J, Hayes AL, Vogel GL (1994 a,b). Response of a de/remineralization in situ model to fluoride dentifrice . *Caries Res* 28:208.

Zero DT .(1995 a,b) : In situ caries models. *Adv Dent Res*; 9:214-23

10. ANEXOS.

Anexo 1. Ficha Clínica



Evaluación de voluntarios para participación en trabajo de investigación titulado “***Efecto del uso tópico del probiótico Lactobacillus Rhamnosus SP1 en en un modelo de caries artificial in situ***”.

Nombre			Rut
Edad		Sexo	(M) (F)
Teléfono		Fecha de nacimiento	

Anamnesis

1. Antecedentes mórbidos:

2. Antecedentes quirúrgicos (Fecha, diagnóstico, procedimiento, complicaciones) :

3. Alergias:

4. Medicamentos (Nombre, dosis, fecha inicio) :

5. Hábitos

- Tabaco:
- Alcohol:
- Drogas:
- Controles odontológicos (frecuencia, fecha último control)

6. Higiene Oral

Frecuencia cepillado:

- Ocasión:
- Tipo de cepillo, pasta, enjuague

Examen Intraoral

1- Apreciación periodontal

- Gingivitis ()
- Periodontitis ()

2- Dentición

C :

O :

Anexo 2 : Acta de aprobación comité de ética



Ed-24 Agosto 2017

ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

INFORME N°.2016/30

Acta de Aprobación de Proyecto FIOUCH titulado "Efecto del consumo de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formatos sistémico y tópico en la morfología, diversidad y composición del biofilm bucal. Modelo *in situ* de caries." Versión 11/2016.

1. Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:

Dr. Eduardo Fernández
Presidente CEC

Dr. Marco Cornejo
Vicepresidente CEC

Dra. Weronika Weil
Miembro Permanente CEC

Sra. Paulina Navarrete
Miembro Permanente CEC

Sr. Roberto La Rosa
Miembro Permanente CEC

Dr. Rodrigo Cabello
Miembro Permanente CEC

Dr. Alfredo Molina
Miembro Permanente CEC

Dra. Paola Llanos
Miembro Permanente CEC

Dr. Juan Estay
Miembro Permanente CEC

Sra. Rebeca Galarce
Representante de la Comunidad

Dra. Viviana Toro
Miembro Alterno CEC

2. Fecha de Aprobación: 03/05/2017

Título completo del proyecto: "Efecto del consumo de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formatos sistémico y tópico en la morfología, diversidad y composición del biofilm bucal. Modelo *in situ* de caries." Versión 11/2016.

3. Investigador responsable: Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez**4. Institución Patrocinante: Facultad de Odontología – Universidad de Chile****5. Documentación Revisada:**

- Proyecto
- Consentimiento Informado (CI)
- Carta de presentación o solicitud de revisión/evaluación.
- Carta de Intención de la Investigador
- Carta de Compromiso de la Investigador
- Carta de Autorización del Uso de Sillón
- Carta del Director de Departamento de Odontología Restauradora

6. Fundamentación de la aprobación

Este proyecto es aprobado luego que se realizaran las modificaciones en relación a los siguientes aspectos:

RESPECTO A ASPECTOS METODOLÓGICOS:

- En el formulario de consentimiento informado, en la sección objetivo de la investigación, adaptarlo al formato sugerido por el CEC, publicado en la página web. Incluyendo nombres del IP e institución patrocinante.

RESPECTO A ASPECTOS JURIDICOS:

- Enviar una declaración de conflicto de intereses.
- Declarar explícitamente que este proyecto no se aplicará en poblaciones vulnerables sujetas a tutorías o evaluaciones directas como los son alumnos de FOUCH.

Ed-24 Agosto 2017

RESPECTO A ASPECTOS ÉTICOS:

Realizar las siguientes modificaciones al C.I.:

- Modificaciones en su lenguaje, especialmente en las secciones de "Procedimiento", que faciliten la comprensión por parte de los sujetos voluntarios. Se requiere incluir a los demás coinvestigadores que pudieran tomar el consentimiento informado.
- Incluir los criterios de exclusión e inclusión dentro del CI.
- Explicar la obtención de los bloques de dientes humanos utilizados en las placas en esta investigación. Presentar documentación que avale la obtención.

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, ha aprobado el Protocolo del estudio titulado "Efecto del consumo de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formatos sistémico y tópico en la morfología, diversidad y composición del biofilm bucal. Modelo *in situ* de caries." Versión 11/2016.



Dr. Eduardo Fernández G.
Presidente CEC



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

Anexo 3. Consentimiento informado participantes



Edición del CI 25/08/2017

Consentimiento Informado Para Participación en Proyecto de Investigación **Dirigido a Adultos**

Título del Protocolo: Efecto del consumo de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formatos sistémico y tópico en la morfología, diversidad y composición del biofilm bucal. Modelo *in situ* de caries

Investigador Principal: Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez

Sede de Estudio: Facultad de Odontología, Universidad de Chile – Sergio Livingstone 943 – Independencia, Santiago.

Nombre del Participante:

.....



Este documento de Consentimiento Informado se aplicará a Adultos y consta de dos partes.

- Información (proporciona información sobre el estudio para usted).
 - Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar).
- Ud. recibirá una copia completa del Documento de Consentimiento Informado.

Este Proyecto está conformado por un equipo investigador y académico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Como Investigador Principal esta Gonzalo Rodríguez Martínez y como Co investigadores, Patricia Palma y Begoña Moreno. Estamos realizando una investigación cuyo objetivo es determinar el efecto que el consumo de probióticos en la composición de la placa dental dependiendo si se toman o se aplican directamente en los dientes. Para ello, se invitarán a participar voluntarios de entre 18 y 30 años de edad.

Le proporcionaremos información y lo invitamos a ser parte de este proyecto. No tiene que decidir hoy si lo hará o no. Antes de tomar su decisión puede hablar acerca de la investigación con cualquier persona de su confianza. Este proceso se conoce como Consentimiento Informado y puede que contenga términos que usted no comprenda, por lo que siéntase con la absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude aclarar sus dudas al respecto. Una vez aclarada todas sus consultas y después que haya comprendido los objetivos de la investigación y si usted desea participar, se le solicitará que firme este formulario.



Justificación de la Investigación

La caries dental es una enfermedad crónica, multifactorial y de alta prevalencia a nivel mundial. El tratamiento convencional de la caries dental ha sido históricamente la remoción quirúrgica del tejido afectado por caries, sin embargo se ha demostrado que el enfoque restaurador basado en la operatoria clásica por sí solo, no logra controlar la enfermedad. Existen diversas estrategias preventivas para el manejo de la caries dental, entre las que se describen algunos mecanismos para modificar la biopelícula o placa dental. Dentro de este último grupo se encuentran los probióticos, que han sido históricamente utilizados en el tratamiento y prevención de una amplia gama de condiciones y patologías del ser humano. Estudios clínicos avalan el uso de probióticos como agentes beneficiosos sobre la salud oral, y en particular un estudio clínico llevado a cabo por nuestro grupo de investigación, demuestra su efecto en la disminución de la incidencia de lesiones de caries en párvulos, sin tener claro cuál es el mecanismo de acción que tiene estas bacterias probióticas.

Objetivo de la Investigación

La presente Investigación tiene por objetivo determinar el efecto que el consumo de probióticos en la composición de la placa dental dependiendo si se toman o se aplican directamente en los dientes. Para ello, se invitarán a participar voluntarios de entre 18 y 30 años de edad.

Beneficio de la Investigación.

Usted podrá conocer su estado de salud oral y aportará con información relevante sobre el efecto de los probióticos en salud oral.

Tipo de intervención y Procedimiento.

Si usted decide participar será examinado para evaluar su situación de salud oral y luego se le invitará a utilizar una placa acrílica en el paladar. Las placas contendrán bloques de dientes humanos estériles. Se le solicitará aplicar azúcar en gotas con un gotario que se le entregará sobre los bloques de diente 8 veces al día y en 2, 3 o 4 de ellas. Dependiendo del grupo al que haya sido asignado, se le solicitará hacer 1 de las siguientes acciones:

- Ingerir 100 ml de agua en la que se ha suspendido una dosis liofilizada de probiótico. Esta acción se realiza con el aparato fuera de la boca
- Aplicar 5 gotas de 100 ml de agua en la que se ha suspendido una dosis liofilizada de probiótico. Esta acción se realiza sobre los bloques de esmalte en el aparato removible.
- Ingerir 100 ml de agua en la que se ha suspendido una dosis liofilizada de probiótico. Esta acción se realiza con el aparato dentro de la boca

Aparte de cada vez que se aplique el probiótico ya sea tópico o sistémico, las placas sólo se removerán para comer y para lavarse los dientes. Las placas serán utilizadas 14 días cada una. El probiótico utilizado es un lactobacilo con probadas propiedades benéficas para el organismo humano.

Al cabo de cada fase experimental, las placas serán devueltas a los Investigadores los que analizarán las bacterias formadas y la desmineralización provocada.

Riesgo de la Investigación.

Usted no correrá ningún riesgo mediante y posterior al procedimiento de la investigación debido a que este protocolo es mínimamente invasivo, la utilización del aparato es inocuo para su salud y la toma de muestras no produce ningún daño. Además, su participación en este estudio no tiene ningún costo económico para usted. En caso de presentar algún tipo de molestia o incomodidad póngase en contacto con los investigadores de este proyecto.

Criterios para selección de los participantes en el estudio

Los criterios de inclusión serán: individuos de ambos sexos, de entre 18 y 30 años de edad, sin enfermedades sistémicas, no fumadores, libres de gingivitis y enfermedad periodontal, con al menos 20 dientes naturales y sin lesiones de caries cavitadas.

Los criterios de exclusión serán: individuos que estén o hayan estado con tratamiento antibiótico o antiséptico los últimos 6 meses previos a participar del estudio e individuos que presenten alteraciones del flujo salival.

Confidencialidad y difusión de datos.

La información obtenida de la investigación, respecto de la identificación de participantes, será mantenida con estricta confidencialidad por el investigador. El nombre y datos personales de usted serán codificados para el uso en este estudio y no serán identificados públicamente. Los resultados emanados de este estudio podrán ser publicados en revistas científicas.

Aclaraciones

- La participación es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la intervención y/o participación.
- Si usted decide puede retirarse cuando lo desee.
- No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- Usted podrá solicitar información actualizada sobre el estudio, al investigador responsable.
- La información obtenida de la investigación, respecto de la identificación de pacientes, será mantenida con estricta confidencialidad por los investigadores.
- Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de su participación, puede si lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado anexa al documento.



Carta de Consentimiento Informado

A través de la presente, declaro y manifiesto, libre y espontáneamente, y en consecuencia, acepto que:

1. He leído y comprendido la información anteriormente entregada y que mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria.
2. He sido informado(a) y comprendo la necesidad y fines de ser atendido.
3. Tengo conocimiento del procedimiento a realizar.
4. Conozco los beneficios de participar en la Investigación
5. El procedimiento no tiene riesgo alguno para mi salud.
6. Además de esta información que he recibido, seré informado(a) en cada momento y al requerimiento de la evolución de mi proceso, de manera verbal y/o escrita si fuera necesaria y al criterio del Investigador.
7. Autorizo a usar mi caso para Investigación y para ser usado como material audiovisual en clases, protegiendo mi Identidad
8. En caso de cualquier duda puede acudir a Sergio Livingstone Pothhammer 943, Independencia, de lunes a viernes en el horario comprendido entre las 8:00 y 17:00 hrs. En el período comprendido en la Investigación y hasta 6 meses después de concluida esta.
9. Si Ud. desea consultar sobre sus derechos como sujeto de Investigación o piensa que estos han sido vulnerados se puede dirigir al representante del Comité Ético de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile: Prof. Dr. Eduardo Fernández, al teléfono (02) 29781742, en horario de oficina o al mail oec.fouch@odontologia.uchile.cl



Doy mi consentimiento al Investigador y al resto de colaboradores, a realizar el procedimiento diagnóstico pertinente, PUESTO QUE SÉ QUE ES POR MI PROPIO INTERÉS.

Nombre del Paciente: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Sección a llenar por el Investigador Principal

He explicado al Sr(a) _____ la naturaleza de la Investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que conozco la normativa vigente para realizar la Investigación con seres humanos y me apego a ella.



Nombre del Investigador Principal: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Nombre del Director del establecimiento donde realiza la Investigación o de su representante

Firma: _____

Fecha: _____

Anexo 4 .Consentimiento donación de terceros molares



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE DIENTES PARA EL ESTUDIO DE MECANISMO DE ACCIÓN DE PROBIÓTICOS

Título del Protocolo: "Efecto del consumo de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formatos sistémico y tópico en la morfología, diversidad y composición del biofilm bucal. Modelo *In situ* de caries"

Investigador Principal: Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez

Sede de Estudio: Facultad de Odontología, Universidad de Chile – Sergio Livingstone 943 – Independencia, Santiago.

Nombre del Donante

Este documento de Consentimiento Informado se aplicará a pacientes con indicación de extracción de terceros molares, y consta de dos partes:

- Información (proporciona información sobre el estudio para usted).
 - Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar).
- Ud. recibirá una copia completa del Documento de Consentimiento Informado.

Mi nombre es Gonzalo Rodríguez Martínez y soy académico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Estoy realizando una investigación de la cual le proporcionaré información y a la que lo invitaré a participar. No tiene que decidir hoy si lo hará o no. Antes de tomar su decisión puede hablar acerca de la investigación con cualquier persona de su confianza. Este proceso se conoce como Consentimiento Informado y puede que contenga términos que usted no comprenda, por lo que siéntase con la absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez aclarada todas sus consultas y después que haya comprendido los objetivos de la investigación y si desea participar, se le solicitará que firme este formulario.

Justificación de la Investigación

Existe evidencia que el consumo de probióticos es útil en la prevención de caries dental, pero se desconoce su mecanismo de acción.

Objetivo

El objetivo del estudio es determinar el efecto que el consumo de probióticos en la composición de la placa dental dependiendo si se toman o se aplican directamente en los dientes. Para ello se montarán en un dispositivo acrílico trozos de dientes humanos estériles.

Beneficios

No existe ningún tipo beneficio inmediato por la participación en el estudio ya que los dientes a utilizar son normalmente desechados. Sin embargo, como consecuencia de esta donación y de la investigación a realizar se espera contribuir a aplicaciones futuras en el ámbito de la odontología.

Tipo de Intervención y Procedimiento

Si usted decide participar los dientes que le serán extraídos serán almacenados para ser posteriormente utilizados en el presente estudio.

Riesgos

Los dientes donados se utilizarán sólo con el fin expuesto y no se guardará ningún registro de su relación con usted como donante. Ningún otro tipo de estudio se realizará con los dientes. Una vez observados y descritos, los dientes serán destruidos y eliminados siguiendo los protocolos de bioseguridad.

La donación en sí no presenta riesgos, ni costos adicionales para usted, y el financiamiento del proceso quirúrgico de extracción será su responsabilidad.

Criterios para selección de los participantes en el estudio

Los criterios de inclusión serán: pacientes con indicación de extracción de terceros molares, cuyos terceros molares estén incluidos.

Confidencialidad y difusión de datos.

La información obtenida de la investigación, respecto de la identificación de participantes, será mantenida con estricta confidencialidad por el investigador. El nombre y datos personales de usted serán codificados para el uso en este estudio y no serán identificados públicamente. Los resultados emanados de este estudio podrán ser publicados en revistas científicas.

Aclaraciones

- La donación del o los dientes es completamente voluntaria
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted en caso de no aceptar la invitación.
- No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.
- No recibirá pago por su donación.
- Usted podrá solicitar información actualizada sobre el estudio, al Investigador responsable.
- La información obtenida de la investigación, respecto de la identificación de pacientes, será mantenida con estricta confidencialidad por los investigadores.
- Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado anexa al documento.

Carta de Consentimiento Informado

A través de la presente, declaro y manifiesto, libre y espontáneamente y en consecuencia acepto que:

1. He leído y comprendido la información anteriormente entregada y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria.
2. Tengo conocimiento del procedimiento a realizar.
3. Conozco los beneficios de participar en la Investigación.
4. El procedimiento no tiene riesgo alguno para mi salud.
5. Además de esta información que he recibido, seré informado(a) en cada momento y al requerimiento de la evolución de mi proceso, de manera verbal y/o escrita si fuera necesaria y al criterio del investigador.
6. En caso de cualquier duda puede acudir a Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez, Sergio Livingsone 943 los días lunes y miércoles de 8:00 – 17:00 o vía telefónica al 29781742 o también se puede dirigir al representante del Comité Ético de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile: Prof. Dr. Eduardo Fernández, al teléfono 229781742, en horario de oficina o al mail cec.fouch@odontologia.uchile.cl

Doy mi consentimiento al investigador y al resto de colaboradores, a realizar el procedimiento pertinente, PUESTO QUE SE QUE ES POR MI PROPIO INTERÉS.

Nombre del participante	Firma	Fecha
-------------------------	-------	-------

Sección a llenar por el Investigador Principal

He explicado al Sr(a) _____ la naturaleza de la investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que conozco la normativa vigente para la realizar la investigación con seres humanos y me apego a ella.

Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez (Investigador Principal)

Nombre del Director de establecimiento, donde se realiza la investigación o de su representante	Firma	Fecha
---	-------	-------

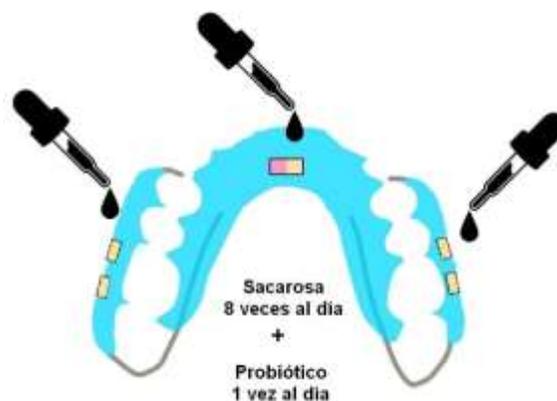
Anexo 5. Información de estudio para pacientes

**PROTOCOLO DE INTERVENCIÓN PROBIÓTICO TÓPICO**

Estimado Participante, bienvenido al estudio titulado “**Efecto del uso tópico del probiótico *Lactobacillus Rhamnosus SP1* en un modelo de caries artificial *in situ***”. Agradecemos profundamente su generosa disposición para ser parte de este proyecto de investigación. A continuación explicaremos paso a paso las maniobras que deberá realizar durante el periodo de experimentación.

Al comienzo del periodo, se le entregará de parte del equipo investigador un bolso que contiene los siguientes elementos:

- Dispositivo intraoral: esta es una estructura acrílica removible que tiene incorporadas por muestras dentarias: 1 muestra en la zona palatina, 2 muestras en la zona vestibular derecha y 2 muestras en la zona vestibular izquierda. El siguiente esquema representa la posición de las muestras en el dispositivo:



- 14 frascos de probiótico
- 2 frascos de 30 ml con sacarosa
- Recipiente para guardar el dispositivo durante la comida

Al comienzo del periodo de experimentación, el cual le será indicado por el equipo de investigadores, Ud. deberá utilizar el dispositivo intraoral durante un periodo continuo de 16 días, 24 horas al día. SÓLO podrá remover el dispositivo desde el interior de la boca para higienizarse los dientes (cepillado), beber líquidos o comer. Esto significa que deberá dormir con el dispositivo por el tiempo que dure el estudio.

Al remover el dispositivo almacenarlo en caja para ello envuelto en 1 cuadrado de toalla nova de 20x20 cm humedecida en 10 mL de agua.

Remover el dispositivo máximo 4 veces al día, 30 min cada vez.

Se recomienda lavarse los dientes al menos dos veces al día, por dos minutos y con pasta fluorurada.

Por otro lado, durante el periodo de experimentación, se debe evitar el uso de los siguientes elementos:

- Enjuague bucal
- Antiácidos
- Medicamentos (por ejemplo antibióticos o antisépticos)

En caso de necesitar utilizar alguno de los elementos descritos, debe comunicarse inmediatamente con el equipo de investigadores para determinar la conducta a seguir.

TODOS LOS ELEMENTOS ENTREGADOS PARA EL ESTUDIO SE DEBEN GUARDAR EN EL BOLSO ORIGINAL y al finalizar el estudio se deben entregar de la misma forma al equipo investigador.

Modo de Aplicación de las Soluciones:

Paso 1: Primera aplicación de sacarosa que se encuentra contenida en el frasco grande: Una vez retirado el dispositivo de la boca, DEBE APLICAR 1 GOTAS DE SACAROSA EN CADA UNA DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO. Inmediatamente luego de aplicar la gota de sacarosa, debe volver a colocar el dispositivo dentro de la boca. Aplicar sacarosa cada 2 horas, 8 veces al día .

Paso 2: Al levantarse por la mañana debe preparar la solución de probiótico: tome 1 de los frascos pequeños, el cual contiene una porción de probióticos liofilizados y mézclelo con 10 ml de agua potable. Agite bien el frasco. ESTA SOLUCIÓN DEBE GUARDARLA EN EL BOLSO PUES DEBERÁ APLICARLA 2 HORAS DESPUÉS DE HABERLA PREPARADO.

Paso 3: 2 horas después de la primera aplicación de sacarosa, nuevamente debe retirar el dispositivo de la boca y proceder a APLICAR LA SOLUCIÓN PREPARADA AL COMIENZO DEL DÍA EN EL FRASCO DE PROBIÓTICO (frasco chico). Debe aplicar 1 gota de probiótico en cada una de las muestras.

Paso 4: Luego de la aplicación del probiótico en el paso 3, debe aplicar inmediatamente 1 gota de sacarosa en todas las muestras. Inmediatamente luego de aplicar la gota de sacarosa, debe volver a colocar el dispositivo dentro de la boca.

Paso 5: Debe continuar aplicando 1 gota de sacarosa en todas las muestras con el dispositivo fuera de la boca, durante todo el día y CADA 2 HORAS, hasta completar un total de 8 APLICACIONES de sacarosa durante todo el día. Una vez aplicada la gota de sacarosa, debe volver a colocarse el dispositivo en el interior de la boca.

Anexo 7. Evaluación de cumplimiento final

Estimado participante, Mediante el siguiente cuestionario evaluaremos el periodo experimental al que fue sometido. Se solicita responder a conciencia y con la mayor honestidad posible las siguientes preguntas. El cuestionario es anónimo.

1. Cumplió con todas las aplicaciones: Si ___ No___
2. Si su respuesta es no ¿cuántas aplicaciones no realizó? :
3. Las aplicaciones de sacarosa fueron cada 2 horas: Si ___ No___
4. Evalúe en la siguiente escala su cumplimiento, marque con una x el número de la escala que siente que más lo representa.

Escala	Significado	
1	No cumplí con ninguna de las aplicaciones ni horarios	
2	Omiti más de 5 aplicaciones durante el periodo experimental	
3	Omiti 2 a 5 aplicaciones durante el periodo experimental	
4	Omiti 1 aplicación durante todo el periodo experimental	
5	Cumplí con todas las aplicaciones con diferencias en los horarios de aplicación de 30 min a 1 hora	
6	Cumplí con todas las aplicaciones con diferencias en los horarios de aplicación de 15 a 20 min aproximadamente	
7	Cumplí con todas las aplicaciones en los horarios establecidos	

5. Marque con una x las siguientes frases si representaron su experiencia

	Si	No
Retiré el dispositivo para alimentarme y lavarme los dientes		
Dormí con el dispositivo		
Omiti algún día del periodo experimental		
Usé el dispositivo según las instrucciones día y noche		

6. En el siguiente espacio anote, con letra clara, observaciones y/o dificultades que tuvo durante el periodo experimental.