



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA Y MEDICINA ORAL

“Efecto del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formato tópico en la diversidad y abundancia bacteriana de la biopelícula en un modelo *in situ* de caries.”

Walter Ignacio Folch Espinosa

TRABAJO DE INVESTIGACION

REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE

CIRUJANO DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Patricia Palma Fluxá

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Gonzalo Rodríguez Martínez

**Adscrito a Proyecto Fiouch, DIFO 17/015
Santiago - Chile
2019**



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA Y MEDICINA ORAL

“Efecto del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formato tópico en la diversidad y abundancia bacteriana de la biopelícula en un modelo *in situ* de caries.”

Walter Ignacio Folch Espinosa

TRABAJO DE INVESTIGACION

REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE

CIRUJANO DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Patricia Palma Fluxá

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Gonzalo Rodríguez Martínez

Adscrito a Proyecto Fiouch, DIFO 17/015
Santiago - Chile
2019

Contenido

1. Resumen.....	6
2. Marco teórico	7
3. Hipótesis y Objetivos.....	16
3.1. Hipótesis.....	16
3.2. Objetivo General.....	16
3.3. Objetivos específicos.....	16
4. Materiales y Métodos	17
4.1. Estudio	17
4.2 Materiales.....	17
4.2.1. Diseño y confección del dispositivo intra oral	17
4.2.2. Protocolo de tratamiento	19
4.2.3. Obtención de muestra de Biopelícula.....	20
4.3. Extracción de ADN	20
4.4. Cuantificación de ADN	21
4.5. Amplificación y secuenciación del gen 16S ADNr	21
4.6. Análisis de datos y gráficos	22
5. Resultados	22
5.1. Muestra	22
5.2. Cuantificación de ADN	23
5.3. Abundancia de género	23
5.4. Abundancia de especies	25
5.4.1. <i>Veillonella</i>	26
5.4.3. <i>Porphyromonas</i>	28
5.4.4. <i>Neisseria</i>	29
5.4.6. <i>Rothia</i>	30

5.4.7. <i>Streptococcus</i>	31
5.4.8. <i>Fusobacterium</i>	32
5.4.9. <i>Haemophilus</i>	34
5.4.10. <i>Capnocytophaga</i>	35
5.4.11. <i>Gemella</i>	36
5.4.12. <i>Granulicatella</i>	37
5.5. Diversidad de género	38
5.6. Diversidad de especie	39
5.6.1. Diversidad en especies específica	41
5.6.1.2 N° de OTUS de especies	42
6. Discusión	44
8. Referencias bibliográficas	54
9. Anexos	58
Anexo 1: Consentimientos informados	58
Anexo 2: Fotos de disolución y siembra <i>L. rhamnosus</i>	64
Anexo 3: Protocolo de manejo del dispositivo	65
Anexo 4: Pauta de aplicación de sacarosa y probiótico	66
Anexo 5: Auto evaluación de cumplimiento	67
10. Glosario	68

1. Resumen

Los probióticos son microorganismos vivos que se han usado para tratar enfermedades del tracto digestivo, sin embargo, en las últimas décadas se ha estudiado tanto sus efectos en la biopelícula oral como en la enfermedad de caries, diversos estudios han concluido que los probióticos presentan un efecto preventivo sobre esta patología y sus marcadores biológicos. Aunque se ha analizado el efecto de variados probióticos en distintos modelos de estudio, aún quedan dudas sobre el mecanismo de acción de los probióticos como agentes preventivos de caries. En este trabajo se estudió el efecto de la aplicación de probiótico *L. rhamnosus* de manera tópica en un modelo *in situ* de caries, para esto se seleccionaron 12 voluntarios a los cuales se les confeccionó un dispositivo acrílico que contenía 5 bloques de esmalte estériles, luego los voluntarios fueron divididos en un grupo expuesto a probiótico y uno control, a estos grupos se les tomó muestras de biopelícula de 3 de los bloques de esmalte tanto al principio como al final del estudio. Se realizó la amplificación del ADNr 16S y posterior pirosecuenciación de las muestras de biopelícula recolectadas para obtener el recuento bacteriano, luego se analizó la abundancia, los índices de diversidad (Shannon y Simpson) y el N° de unidades taxonómicas operacionales (OTUS) de cada muestra. A partir de nuestros resultados se observó que la diversidad y abundancia de los grupos no varió de manera significativa luego de finalizada la intervención. Por otro lado, al analizar el N° de OTUS por género se detectó que los géneros *Veillonella*, *Leptotrichia*, *Neisseria*, *Porphyromonas*, *Haemophilus* y *Capnocytophaga* presentaron comportamientos contrarios entre los grupos probiótico y control, sugiriendo que este comportamiento podría atribuirse a la incorporación de *L. rhamnosus*. Sin embargo, se hace evidente la necesidad de más estudios en el área.

2. Marco teórico

La caries dental es una enfermedad crónica que provoca la destrucción localizada de los tejidos duros del diente debido a la producción de ácidos derivados de la fermentación de carbohidratos por bacterias (Fejerskov y Kidd, 2008). Además de entenderse la desmineralización y posterior cavitación como los signos de la enfermedad, se comprende como un proceso mediado por una disbiosis que se inicia en la biopelícula que se deposita y acumula sobre la superficie de los dientes (Selwitz et al., 2007, Twetman *et al.*, 2018). Los factores de riesgo asociados a caries incluyen factores físicos, biológicos, medio ambientales, de comportamiento y relacionados con los estilos de vida. Entre ellos, se encuentran un alto número de bacterias cariogénicas, inadecuado flujo y/o composición salival, insuficiente exposición a fluoruros, higiene oral deficiente y condiciones de pobreza. (Selwitz *et al.*, 2007)

La caries dental es una enfermedad crónica de progresión lenta en la mayoría de las personas, se puede presentar en la corona o la raíz del diente, puede afectar esmalte, dentina y cemento. Además de encontrarse tanto en superficies lisas o en surcos y fisuras, las lesiones se manifiestan clínicamente en diversos estadios (Fejerskov y Kidd, 2008). La caries dental no es solo el término utilizado para describir la lesión (cavitación, desmineralización) sino que también describe los eventos metabólicos que ocurren en la biopelícula que cubre el área afectada.

Dicha enfermedad se presenta de manera muy común a nivel de todas las edades, de acuerdo al estudio de la carga global de enfermedades, lesiones y factores de riesgo al año 2010, la caries dental no tratada en dentición permanente constituye la condición más prevalente evaluada para la totalidad del estudio, con una prevalencia global del 35% para todas las edades combinadas, por otro lado la caries dental no tratada en dentición temporal ocupa el décimo lugar de prevalencia, afectando al 9% de la población global (Marcenes et al., 2013). De no tratarse, puede provocar en sus estadios más avanzados, dolor, pérdida de dientes y disminución de la calidad de vida de quienes la padecen.

La caries dental es un problema de salud pública y una enfermedad altamente prevalente en Chile y el mundo. Según el último informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la caries afecta al 60-90% de los escolares y cerca del 100% de los adultos (Petersen, 2003).

Desde un punto de vista químico, la caries dental puede ser entendida como una pérdida de iones desde la superficie del diente hacia la saliva. Si la difusión o el flujo de iones calcio, fosfato y carbonato desde la superficie del diente hacia la saliva continúa de manera permanente, se producirá pérdida neta de minerales y eventualmente una cavitación (Selwitz *et al.*, 2007). La caries dental es una enfermedad que se puede controlar y potencialmente revertir en sus etapas iniciales. Sin embargo, si la lesión progresa, se detiene o se revierte dependerá del balance entre desmineralización y remineralización del esmalte dentario. Por lo cual, es importante conocer el proceso y etiopatogenia, sus factores de riesgo, sus formas de prevención y tratamiento, de manera de intervenir eficazmente a nivel comunitario e individual.

En una revisión publicada por Marsh en el 2010, explica que a los segundos de erupcionar o momentos después de higienizar, la superficie dentaria es cubierta por una película de moléculas derivada principalmente de la saliva, el fluido gingivo crevicular, proteínas y glicoproteínas bacterianas. Inicialmente solo algunas especies de bacterias son capaces de adherirse a esta película, las cuales son especies comensales de la cavidad oral y son denominados colonizadores primarios, compuestos mayoritariamente por *Streptococcus spp.* se caracterizan por usar receptores complementarios en la película formada para adherirse de manera irreversible.

Posteriormente el metabolismo de los colonizadores primarios comienza a modificar el medio local (reduciéndolo), luego de consumir el oxígeno disponible, la biopelícula evoluciona y se puede observar cómo, mediante procesos de coagregación, se van incorporando los colonizadores secundarios y tardíos, muchos de ellos anaerobios estrictos. En la biopelícula las bacterias comienzan a producir polímeros extracelulares conformando la matriz, la cual es más que un mero andamio ya que puede retener y adherir moléculas como enzimas y retrasar

la penetración de moléculas con carga hacia el interior. (Marsh, 2010, Nigel *et al.*,2017)

La biopelícula está espacial y funcionalmente organizada; lo cual induce nuevos patrones de expresión genética en los residentes, al mismo tiempo la proximidad de los residentes proporciona la oportunidad para la interacción bacteriana, tales como: 1) formación de cadenas alimentarias y cooperación metabólica, 2) señalización célula-célula, 3) transferencia genética, 4) producción de moléculas inhibitoras para excluir microorganismos que compitan por el sitio y nutrientes. Una vez establecida, la composición de la microbiota permanece relativamente estable en el tiempo a menos que ocurran importantes cambios en el ecosistema. (Marsh, 2010. Nigel *et al.*,2017)

Desde un punto de vista microbiológico la caries dental es un proceso, en que los estadios de la enfermedad se caracterizan por una severidad creciente. El proceso se inicia en presencia de carbohidratos fermentables (sacarosa, glucosa y fructosa, etc.) disponibles y microorganismos acidogénicos de la biopelícula, los cuales producen ácidos orgánicos débiles como resultado de su metabolismo, lo cual genera una reducción del pH local por debajo del valor crítico de 5,5 dando paso, tanto a la selección de microorganismos acidogénicos, como a la disolución del cristal de hidroxiapatita encontrado en esmalte, dentina y cemento. (Kawashita *et al.*, 2011), Dicho proceso es el resultado de un desbalance ecológico en el equilibrio fisiológico entre los minerales del diente y los microorganismos presentes en la biopelícula.

De acuerdo a la teoría ecológica de placa propuesta por Marsh, la enfermedad de caries ocurre como consecuencia de un desbalance en la microbiota comensal residente producto del enriquecimiento de la biopelícula en bacterias potencialmente más cariogénicas debido a condiciones frecuentes de bajo pH en respuesta a cambios en la dieta o en la secreción salival (Marsh, 2010). La selección de bacterias patogénicas o patobiontes, está directamente asociada a cambios en el medio ambiente y la enfermedad no tiene una causa específica, sino que cualquier especie que presente rasgos cariogénicos relevantes tales

como producción y tolerancia a ácidos y producción de polisacáridos intra y extracelulares, podrían contribuir al proceso de caries (Marsh, 2010).

En 2008, Nyvad y Takahashi propusieron una extensión a esta teoría ecológica. En ella, los autores plantean que cuando el suministro de azúcar es abundante o la secreción salival es muy escasa para neutralizar los ácidos producidos por la biopelícula, la disminución de pH en la placa aumenta la acidogenicidad y la acidurancia de las bacterias del grupo *Streptococcus* no *mutans* de manera adaptativa. Bajo estas condiciones de severa y prolongada exposición a ácidos se produce una selección de bacterias de "bajo pH" y *Actinomyces* spp. resultando en una microbiota más acidogénica. Estos cambios en el fenotipo de la microbiota pueden cambiar el balance neto entre la desmineralización y remineralización produciendo pérdida de minerales. Cabe destacar que este proceso no solo involucra a *S. mutans* y *Lactobacillus* spp., sino también a cepas acidúricas de *Streptococcus* del grupo no-*mutans*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium* y levaduras. Así, muchos microorganismos acidogénicos y acidúricos están involucrados en el proceso de caries, apoyando la noción de que la etiología de la caries dental es muy compleja. (Takahashi y Nyvad, 2008; 2011, Nigel et al., 2017).

Adicionalmente, los estudios realizados por Mira en el 2015, desde la perspectiva metagenómica han permitido proponer la hipótesis de que la caries dental es, un proceso compuesto de dos etapas: iniciación o desmineralización de esmalte, seguida de la progresión a través de la dentina. En los ensayos, se describió que la diversidad y funciones microbianas son distintas en las diferentes etapas de la progresión de la caries dental. La mayor diversidad bacteriana encontrada correspondió a muestras de placa dental, la que disminuyó dramáticamente en las muestras de lesiones de caries dentinaria y dentinaria profunda. El nicho ecológico menos diverso encontrado en la cavidad oral fue el sitio de la lesión de mancha blanca, donde se encontró comparativamente, el menor número de especies bacterianas (Simón-Soro *et al.*, 2013). La importancia de estos hallazgos radica en que las bacterias que habitan los ambientes asociados a caries son tan sólo un subconjunto de la comunidad bacteriana total, donde las lesiones de caries representan nichos ecológicos selectivos que permiten el crecimiento y

sobrevivencia de bacterias especializadas. Y que si bien el uso de muestras de saliva se ha considerado históricamente apropiado para estudios epidemiológicos, investigaciones microbiológicas futuras que pretendan responder interrogantes sobre la etiología o factores de riesgo de la enfermedad, debieran centrarse en la microbiología del sitio-específico, esto es, de la lesión de caries dental, reorientándose hacia nuevas técnicas de muestreo.

Por otra parte el tratamiento convencional de la caries dental ha sido históricamente la remoción de la lesión. Sin embargo, se ha demostrado que el enfoque restaurador basado en la operatoria clásica por sí solo, no logra controlar la enfermedad. El desarrollo de lesión de caries asociada a una restauración preexistente es una situación común y también la primera causa de fracaso de restauraciones. Por lo tanto, el enfoque de tratamiento debe centrarse en impedir que se produzca una lesión de caries (prevención primaria) y en un tratamiento temprano de la lesión (prevención secundaria), además de medidas complementarias como el cepillado con pastas fluoradas (Kawashita *et al.*, 2011). Más aún, el tratamiento convencional puede provocar sobretratamiento y costos innecesarios (Graves *et al.*, 2004) lo cual presenta un incentivo más para alejarnos del tratamiento clásico y centrarnos en la prevención o tratamientos no invasivos.

Por lo mencionado, se han desarrollado diversas estrategias preventivas para el manejo de la caries dental, entre las que se describen algunos mecanismos para modificar la biopelícula y así reducir el desafío cariogénico. Dentro de este último grupo se encuentran las bacterias probióticas, las que han sido, en las últimas décadas, utilizadas en el tratamiento y prevención de una amplia gama de condiciones y patologías en el ser humano (Longbottom *et al.*, 2009).

Los probióticos son microorganismos vivos que actúan como suplemento alimenticio y pueden beneficiar al hospedero influenciando el balance entre las especies comensales de la microbiota intestinal y oral (Caglar *et al.*, 2009). Actualmente para considerar que una bacteria posee efecto probiótico debe cumplir con una serie de requisitos tales como: identificar la especie y familia del probiótico, considerar estudios *in vitro* complementados con estudios *in vivo* en animales y humanos, entre otros (WHO/FAO, 2002). En relación al mecanismo de

acción de los probióticos se han propuesto diferentes vías. Sin embargo, los estudios aún son poco concluyentes, algunos de ellos se asocian a la producción de algunas sustancias antimicrobianas como: peróxido de hidrogeno, ácidos orgánicos y bacteriocinas, además podrían competir con la adhesión a la mucosa. Por otro lado, los probióticos pueden modificar el ambiente circundante modulando el pH y/o el potencial de óxido reducción. Finalmente podrían presentar beneficios estimulando la respuesta inmune no específica del hospedero (Bonifait *et al.*, 2009).

El estudio del efecto de la terapia con probióticos es de interés, no sólo a nivel de salud general, sino también, en el control y la prevención de la caries dental. El principio básico que sustenta el uso de bacterias probióticas radica en la introducción de una cepa efectora, no patógena, en la microbiota del hospedero permitiendo mantener o restaurar el microbioma natural al interferir o inhibir a otros microorganismos, especialmente aquellos patógenos (Twetman y Keller, 2012). El uso de probióticos en relación a caries dental se debe al potencial que éstos presentan de sustituir o desplazar a las bacterias cariogénicas de la cavidad oral (Longbottom *et al.*, 2009).

Las principales cepas aisladas o desarrolladas para aplicaciones gastrointestinales han sido también adoptadas y estudiadas para verificar su efecto a nivel de la cavidad oral, persiguiendo diversos objetivos, tales como: reducción de incidencia de caries, control del pH de la biopelícula, modificaciones en el recuento de especies del grupo *Mutans Streptococci* y otros microorganismos cariogénicos.

Entre las cepas probióticas destacan *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus rhamnosus* LB21, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus. paracasei*, *Lactobacillus brevis* CD2, *Bifidobacterium* spp., entre otras (Cagetti *et al.*, 2013). En general *Lactobacillus* spp. son considerados bacterias cariogénicas, sin embargo, estudios clínicos e *in vitro* apoyan la idea de sus efectos beneficiosos en la salud oral (Badet y Thebaud, 2008).

En una revisión sistemática publicada en el 2012 por Twetman y Keller, se presentó la evidencia disponible correspondiente a 33 publicaciones, las cuales

variaban entre estudios *in vitro* y estudios clínicos controlados realizados en humanos, en los que se estudia el rol de la administración de probióticos sobre el desarrollo de caries y los factores de riesgo asociados a ella. Los resultados del análisis demostraron ser positivos presentándose reducción en la presencia de *Streptococcus mutans* en saliva (estudio en humanos) luego de ingerir el probiótico. En otra revisión publicada el 2016 por Gruner y Paris donde se analizaron 50 publicaciones, las cuales fueron publicadas entre 2001 y 2015 y presentaban principalmente estudios de tipo grupos paralelos y *cross-over* en humanos en los cuales se estudia el efecto del probiótico en factores de riesgo de caries tales como recuento de *S. mutans* y *Lactobacillus spp.* Los resultados del análisis indican que si bien muchos estudios logran demostrar disminución de recuento de *S. mutans*, aun la evidencia es insuficiente para usar probióticos en el tratamiento de las caries, sin embargo, al no presentar efectos adversos ni aumento en el riesgo de caries tampoco hay argumento suficiente para rechazar la terapia con probióticos. (Gruner y Paris, 2016). Además, Jorgensen *et al.* realizaron, también en el 2016, una revisión buscando específicamente trabajos cuyo método de evaluación fuera aparición o progresión de caries en dientes primarios de niños de 0 a 6 años, encontraron 7 publicaciones las cuales indicaban que los probióticos prevenían o reducían las caries tempranas de la infancia, sin embargo, solo hubo una diferencia estadísticamente significativa en 4 de los estudios (Jorgensen *et al.*, 2016).

Los resultados de un estudio clínico comunitario controlado aleatorizado por *clusters* (Rodríguez *et al.*, 2016) evidenciaron que en una población de preescolares luego de 10 meses de consumo regular de leche con probiótico *L. rhamnosus*, el grupo experimental presentó valores de prevalencia de caries, incidencia de nuevos niños con lesiones de caries, incidencia de nuevos dientes con lesiones de caries tanto cavitadas como no cavitadas, significativamente menores que el grupo control ($p < 0,05$). Por su parte, la prevalencia de lesiones de caries cavitadas y no cavitadas y la incidencia de nuevos dientes con lesiones de caries solo cavitadas, aun cuando presentaron valores menores, estos no fueron significativos ($p > 0,05$). Nase *et al.* el 2002 realizo un estudio placebo-control de 7

meses con niños preescolares en el cual demostró que para los niños de 3 a 4 años el consumo de probióticos reducía el riesgo de caries significativamente.

Un mecanismo de acción que podría explicar de forma teórica los resultados clínicos beneficiosos de estos estudios podría tener relación con que la cepa probiótica interfirió y modificó la biopelícula oral, modulando la ecología local interfiriendo con el desarrollo de bacterias patógenas productoras de ácidos orgánicos, logrando así que el pH se mantenga por sobre la cifra crítica y se conserve el balance desmineralización/remineralización. Considerando este posible efecto tópico, las bacterias probióticas tendrían que haber ocupado el hábitat de las bacterias patógenas mediante fenómenos de adhesión a estructuras orales y desarrollando competencia con los microorganismos cariogénicos, ya que la adherencia es un factor esencial para la colonización.

Diversos estudios a corto plazo parecen indicar que la colonización del medio oral es de carácter temporal, la mitad de los participantes dejan de evidenciar probiótico en saliva para el primer día luego de terminar con la exposición y para el séptimo día solo algunos individuos lo presentaban. (Caglar *et al.*, 2009; Petti *et al.*, 2001; Yli-Knuutila *et al.*, 2006)

Por otro lado, se ha postulado previamente que para que el probiótico consiga los efectos biológicos deseados, éste deba instalarse de manera permanente en la cavidad oral, ya que si el tiempo de contacto que tiene con la biopelícula es reducido, la actividad de éste sería débil. Productos que contienen *L. rhamnosus* GG muestran un rápido *clearance* de la boca al finalizar la ingesta. Estudios en heces, placa y saliva muestran que las bacterias probióticas se pueden detectar hasta una semana después de finalizado el consumo y es por ello que el diseño de estudios clínicos se basan en el consumo diario regular. Cabe destacar que en un análisis hecho por Teughels *et al.* el año 2008, se menciona la dificultad para un probiótico exógeno de poder competir con la microbiota endógena y se sugiere, por lo tanto, el tratamiento previo con antibióticos de amplio espectro para aumentar las chances de colonización.

Al analizar los estudios sobre el tema, es evidente que en su gran mayoría utilizan marcadores subrogantes, tal como las unidades formadoras de colonias de *S. mutans*, para determinar el riesgo de caries y solo unos cuantos investigadores analizan el desarrollo de nuevas caries o la progresión de las lesiones previamente establecidas para determinar el riesgo de caries (Gruner y Paris, 2016), estos últimos son marcadores mucho más certeros a la hora de evaluar la efectividad de los tratamientos con probióticos.

Un tipo de modelo de estudio que permite estudiar el fenómeno de caries sin poner en riesgo a los participantes es el modelo *in situ*. El modelo *in situ* permite analizar un fenómeno en el lugar y condiciones donde este mismo se desarrolla, además permite simular la compleja condición intra oral a la vez que se incorporan protocolos de experimentación determinados por el investigador (Young-Hye Sung *et al.*, 2014). Para implementar un modelo *in situ* es necesario fabricar un aparato removible que sostendrá bloques de esmalte de volumen variable, estos dispositivos son usados por los voluntarios por un tiempo determinado por el investigador, mientras son (generalmente) instilados con sacarosa a intervalos regulares.

Los modelos *in situ* son cercanos a la situación clínica debido a la formación de biopelícula, así mismo se ha demostrado que son capaces de generar caries en bloques de esmalte en un periodo de 14 días (Moron *et al.*, 2012. Cury JA *et al.*, 1997) significando una herramienta adecuada para evaluar la forma en que diversos agentes interactúan con el proceso de caries tales como fluoruros (Cury JA *et al.*, 1997) o probióticos.

Dado lo expuesto, nos encontramos con que la evidencia es poco concluyente con respecto al mecanismo de acción de los probióticos. Adicionalmente tampoco se ha determinado si su efecto en la disminución de la incidencia de lesiones de caries es debido a una aplicación tópica, sistémica o mixta y cómo esto se ve reflejado en las características de la biopelícula oral. Por lo mencionado, es que se plantea la siguiente pregunta de investigación ¿Cuál es el efecto del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formato tópico en la diversidad y abundancia de la biopelícula bucal en un modelo *in situ* de caries?

3. Hipótesis y Objetivos

3.1. Hipótesis.

Existen diferencias en la diversidad y abundancia bacteriana de la biopelícula obtenida en un modelo *in situ* de caries entre un grupo instilado con *Lactobacillus rhamnosus* comparado con un grupo control.

3.2. Objetivo General.

Establecer la diferencia de diversidad y abundancia bacteriana en biopelícula obtenida en un modelo *in situ* de caries entre un grupo instilado con *Lactobacillus rhamnosus* y uno control.

3.3. Objetivos específicos.

1. Determinar la diversidad y abundancia bacteriana en biopelícula obtenida en un modelo *in situ* de caries en un grupo instilado con *Lactobacillus rhamnosus*.
2. Determinar la diversidad y abundancia bacteriana en biopelícula obtenida en un modelo *in situ* de caries en un grupo control.
3. Determinar diferencias en la diversidad y abundancia bacteriana en biopelícula entre grupo probiótico y grupo control.

4. Materiales y Métodos

4.1. Estudio

Tipo de estudio: Analítico experimental, que incluye un modelo de caries *in situ*.

Este estudio se encuentra adscrito al proyecto de investigación Fiouch el cual comprende 2 líneas de investigación, la primera que analiza la microbiología y otra que analiza la micro dureza, así mismo cuenta con 4 grupos de estudio: grupo control, grupo probiótico tópico, grupo probiótico sistémico y grupo probiótico mixto. El presente estudio comprende la rama microbiológica y solo analiza los primeros dos grupos experimentales.

Para seleccionar a los voluntarios se aplicaron los siguientes criterios: a) Criterios de inclusión: Sujetos adultos mayores de 18 años, sistémicamente sanos, no fumadores, libres de enfermedad gingival, libres de caries sin tratar (C= 0), con un máximo de 2 obturaciones (O= 2) y sin pérdida de dientes (P= 0). b) Criterios de exclusión: Sujetos sometidos a tratamientos antibióticos o antisépticos bucales en un plazo de seis meses anteriores a la fecha de inclusión en el estudio. Sujetos que presentaran alteraciones en el flujo salival o consumo de fármacos que alteren el flujo salival.

4.2 Materiales

4.2.1. Diseño y confección del dispositivo intra oral

- 1) Obtención del modelo: Se obtuvo un modelo de yeso de la arcada superior de cada voluntario mediante una impresión de alginato con cubeta stock.

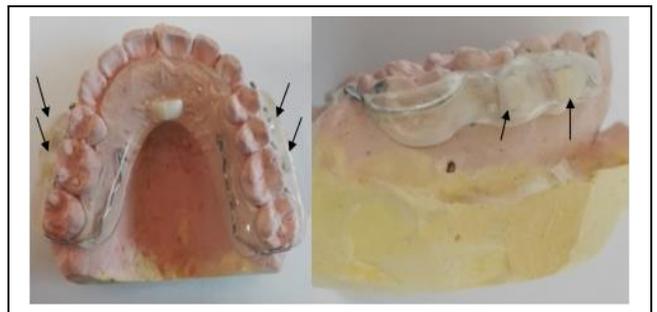


Fig 1: Plataforma de acrílico montada en modelo de yeso, las flechas señalan bloques de esmalte vestibular.

- 2) Obtención plataforma de acrílico: Se envió el modelo de yeso al laboratorio bajo instrucciones de confeccionar el aparato acrílico removible que sirvió de plataforma para el montaje de 5 bloques de esmalte (Fig 1).

3) Obtención de los bloques de esmalte:

- a) Los bloques se prepararon desde terceros molares incluidos que fueron extraídos, estos fueron donados por pacientes con indicación de extracción y que consintieron voluntariamente (anexo 1).
- b) Los molares se mantuvieron en solución de Timol 0.1%, por al menos un mes (Cury JA *et al.*,1997). Para asegurar la esterilidad de los bloques de esmalte, estos fueron autoclavados.
- c) Se cortaron bloques de esmalte de dimensiones 2x2x2 mm y 2x2x3 mm utilizando un disco de corte de diamante.

- 4) Obtención del dispositivo: Los bloques de esmalte fueron rotulados con números del 1 al 5 empezando desde la derecha del dispositivo (Fig 2), se ubicaron (utilizando adhesivo para mantenerlos en su lugar) 4 por vestibular (2x2x2 mm) y uno por palatino (2x2x3 mm) (Cury JA *et al.*,1997), este último se encuentra cubierto con aislante en su mitad izquierda y fue utilizado en otra investigación.

A cada paciente se le instaló su dispositivo y se corrigió cualquier interferencia o molestia que presentara, luego se les entregó las instrucciones y se les indicó que iniciaran el tratamiento al cabo de 2 días.



Fig 2: Numeración de los bloques de esmalte en dispositivo acrílico

4.2.2. Protocolo de tratamiento

Los voluntarios fueron asignados por conveniencia a 2 grupos de experimentación, localizados en diferentes regiones, uno en la Región Metropolitana de Santiago y otro en la Región de Valparaíso (A y B), siguiendo el siguiente protocolo de aplicación:

Grupo A, estudiantes de Odontología de la Región Metropolitana de Santiago: este grupo fue expuesto al uso de probiótico y sacarosa al 20% de manera tópica. Se les instruyó instilar, sobre los bloques de esmalte, 1 gota (50 μ L) de solución de 20% de sacarosa, 8 veces al día cada 2 horas (Aires C.P *et al.*,2006) y 5 gotas de suspensión de *Lactobacillus rhamnosus*

SP1, preparada en 100 mL de agua (Sacco, Italia) en una concentración de 10^8 UFC/ml (anexo 2), 1 vez al día en conjunto con la primera aplicación de sacarosa (Fig 3).

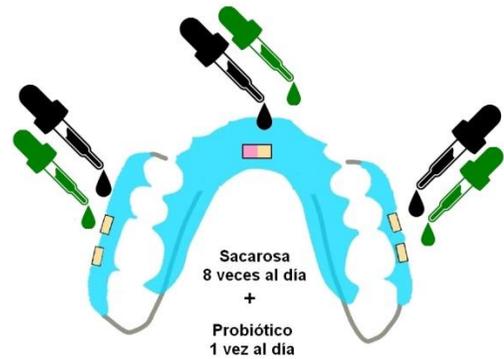


Fig 3: Protocolo de tratamiento grupo A.



Fig 4: Protocolo de tratamiento grupo B.

Grupo B, estudiantes de Odontología de la Región de Valparaíso: este grupo fue expuesto solo a sacarosa al 20% de manera tópica. Se les instruyó instilar, sobre los bloques de esmalte 1 gota de solución de 20% de sacarosa, 8 veces al día cada 2 horas (Aires C.P *et al.*,2006) (Fig 4).

Los voluntarios debieron utilizar los aparatos día y noche por 16 días, absteniéndose de fumar, usar colutorios y consumir bebidas alcohólicas mientras ocuparon el dispositivo. Para cepillar sus dientes los participantes debían retirar el dispositivo.

4.2.3. Obtención de muestra de Biopelícula

- 1) Primera recolección: Pasados los primeros 2 días los voluntarios fueron citados a la clínica odontológica de la facultad de Odontología U. de Chile para recoger la biopelícula acumulada en los bloques vestibulares con cucharitas estériles (69/70), se recogió un pool de biopelícula que fue depositado en un tubo centrifuga tipo eppendorf que contenía 100 μ L de solución buffer TE, se definieron estas muestras como el tiempo 1 (T1). Luego de tomadas estas muestras todos los voluntarios debieron utilizar los dispositivos por 14 días más, iniciando el tratamiento correspondiente al grupo que pertenecía cada individuo. Accesoriamente, se les entregó instrucciones detalladas sobre el uso del dispositivo (anexo 3).
- 2) Segunda recolección: Terminado el período de 14 días, se repite el proceso descrito anteriormente, estas muestras fueron definidas como el tiempo 2 (T2).

La evaluación del compromiso y cumplimiento, por parte de los voluntarios, se realizó mediante una pauta que se les entregó por escrito en la que ellos, a conciencia, registraron la aplicación de los tratamientos por hora (anexo 4) y una encuesta que se efectuó posterior al término del tratamiento que evaluó el cumplimiento del protocolo, además de las desventajas que puede tener el modelo *in situ* en cuanto a uso y la comodidad del dispositivo (anexo 5).

4.3. Extracción de ADN

La biopelícula obtenida se resuspendió y homogenizó en vortex 45 segundos. Para la extracción de ADN se utilizó el Kit Epicentre, MasterPure® y se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, a la muestra se le incorporó 130 μ L de Buffer de Lisis y lisozima, luego se incubó a 37°C por 1 hr, seguido por incubación en a 65°C con 1 μ L de proteinasa K. Se agregó 300 μ L de precipitante de proteínas (MPC) y se recuperó (por centrifugación) 300 μ L de sobrenadante al que se incorporó isopropanol para precipitar el ADN y 2 lavados con etanol. El ADN obtenido se rehidrató con agua libre de nucleasas estéril.

4.4. Cuantificación de ADN

Una vez obtenido el ADN de cada muestra, se cuantificó por fluorometría utilizando el sistema Qubit, que permite determinar la concentración de ADN en las muestras analizadas.

4.5. Amplificación y secuenciación del gen 16S ADNr

Los siguientes procedimientos descritos fueron realizados en los Laboratorios para el Estudio del Microbioma Oral del Centro Superior de Investigación en Salud Pública de Valencia, España (Fisabio).

Utilizando el ADN genómico se obtuvieron amplicones del gen 16S ADNr, para la preparación de librerías y posterior secuenciación metagenómica. Se utilizaron *primers* específicos descritos por Klindworth *et al* (2013) con la adición de adaptadores que permiten mejorar el rendimiento de secuenciación. Las secuencias específicas utilizadas en este protocolo codifican para las regiones V3 y V4 del gen 16S ADNr, resultando en un amplicon único de 460 pb. Luego de la amplificación del gen 16S ADNr, el ADN fue secuenciado en un secuenciador Miseq de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Illumina) usando el protocolo con un control pareado de 2x300 pb.

Para el análisis, sólo se consideraron las secuencias pareadas y sobrepuestas. Se realizó un control de calidad a las secuencias utilizando el programa PRINSEQ (Schmieder y Edwards, 2011). Secuencias con un largo menor a 250 nucleótidos no fueron consideradas; el trimado de las secuencias fue realizado eliminando nucleótidos que no cumplieran con un estándar mínimo de calidad. Secuencias quiméricas del 16S ADNr fueron filtradas usando el programa USEARCH (Edgar *et al.*, 2011). Las secuencias obtenidas y seleccionadas fueron clasificadas taxonómicamente por el RDP-classifier (Wang *et al.*, 2007) y Dada2 *pipeline* (Callahan *et al.*, 2016).

4.6. Análisis de datos y gráficos

Para presentar la distribución proporcional del valor de importancia de cada especie o abundancia relativa (Moreno, 2001), en cada uno de los cuatro grupos se graficó las proporciones según número de unidades taxonómicas operativas (N° OTUS) de cada género. El criterio propuesto para considerar la inclusión de un género fue que éste debía estar presente en todos los sujetos. Una vez determinados los géneros más abundantes, se analizaron, de la misma manera, las especies pertenecientes a estos géneros mediante gráficos de proporción.

Para analizar la biodiversidad intrínseca en cada comunidad oral o alfa-diversidad (Moreno, 2001), se utilizó tanto los índices de Shannon y Simpson como también el número de OTUS, tanto a nivel de género como a nivel de especie, los datos se analizaron entre grupos (control, probiótico) y entre tiempos (tiempo 1, tiempo 2), para el análisis del grupo control tiempo 2 y probiótico tiempo 2, se analizaron los deltas (diferencia entre T1 y T2), en estos análisis de dos grupos se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para comprobar la presencia de una distribución normal. Para evaluar la significancia estadística se aplicaron pruebas *T Student* y *T Student* pareado según fuera el caso. En caso de no presentarse una distribución normal se utilizaron pruebas no paramétricas como Mann-Whitney o Wilcoxon para datos pareados o no pareados respectivamente. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism versión 8.0.0, con un intervalo de confianza del 95%.

5. Resultados

5.1. Muestra

En este trabajo participaron 12 voluntarios, 6 femeninos y 6 masculinos entre 18 y 29 años, con buena higiene oral, índice de sangrado menor al 20%, libres de caries sin tratar ($C=0$), con un máximo de 2 obturaciones ($O \leq 2$) y sin pérdida de dientes ($P=0$), a cada uno se le asignó un número identificador de un dígito si pertenecía al grupo probiótico o de 2 dígitos si pertenecía al grupo control. Uno de

los participantes fue eliminado del estudio por necesidad de tratamiento con antibiótico dentro de los primeros días del estudio y otro participante se retiró del estudio horas antes de comenzar con la instalación del dispositivo.

5.2. Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN en sistema Qubit resultó variada. Sin embargo, en cada muestra la cantidad de ADN encontrado fue adecuada para proceder con el procedimiento de secuenciación.

5.3. Abundancia de género

La metodología de secuenciación empleada para este estudio permitió detectar un total de 246 géneros. Para el análisis de datos se aplicó los siguientes criterios: Los géneros debieron encontrarse en todos los participantes del grupo y tiempo correspondiente, el total de géneros considerados debían comprender al 95% de la biopelícula de la muestra. Luego de aplicados estos criterios se obtuvo, en total, 13 géneros.

Al agrupar los géneros por *Phylum*, en el grupo probiótico T1, *Firmicutes* fue el dominante (49%), seguido por *Fusobacteria* (17%), *Proteobacteria* (12%), *Bacteroidetes* (12%) y finalmente *Actinobacteria* (9%), posterior a la exposición a probiótico se observó como *Phylum* dominante a *Firmicutes* (65%) seguido por *Proteobacteria* (13%), *Bacteroidetes* (8%), *Fusobacteria* (8%) y finalmente *Actinobacteria* (6%). En el grupo control la distribución se mantuvo tanto antes como después de la exposición a sacarosa, sin embargo, los porcentajes variaron: *Firmicutes* (72% / 79%), *Actinobacteria* (14% / 9%), *Proteobacteria* (8% / 5%), *Fusobacteria* (1% / 2%) respectivamente.

Al ordenar los géneros por abundancia se observó que en el grupo probiótico en T1 el más abundante resultó ser *Veillonella* seguido de *Leptotrichia*, *Rothia*, *Neisseria*, *Porphyromonas*, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Capnocytophaga*, *Haemophilus*, *Gemella*, *Granulicatella* (Fig 5 A). Para el T2 nuevamente *Veillonella* resultó ser el más abundante seguido de *Haemophilus*, *Streptococcus*,

Fusobacterium, *Granulicatella*, *Capnocytophaga*, *Porphyromonas*, *Neisseria*, *Leptotrichia*, *Actinomyces*, *Rothia*, *Gemella*, *Campylobacter* (Fig 5 B). Por otra parte, en el grupo control en T1, el género *Veillonella* mantuvo el predominio, seguido de *Streptococcus*, *Rothia*, *Neisseria*, *Granulicatella*, *Haemophilus*, *Gemella*, *Leptotrichia* (Fig 5 C), y en T2 se caracterizó por mantener la misma distribución de la abundancia que en T1 en los primeros 5 géneros (Fig 5 D)

Del total de 11 géneros clasificados como los más abundantes en el grupo probiótico en T1, el 100% de ellos se conservó en T2 (Fig 5 A, B). Por otro lado,

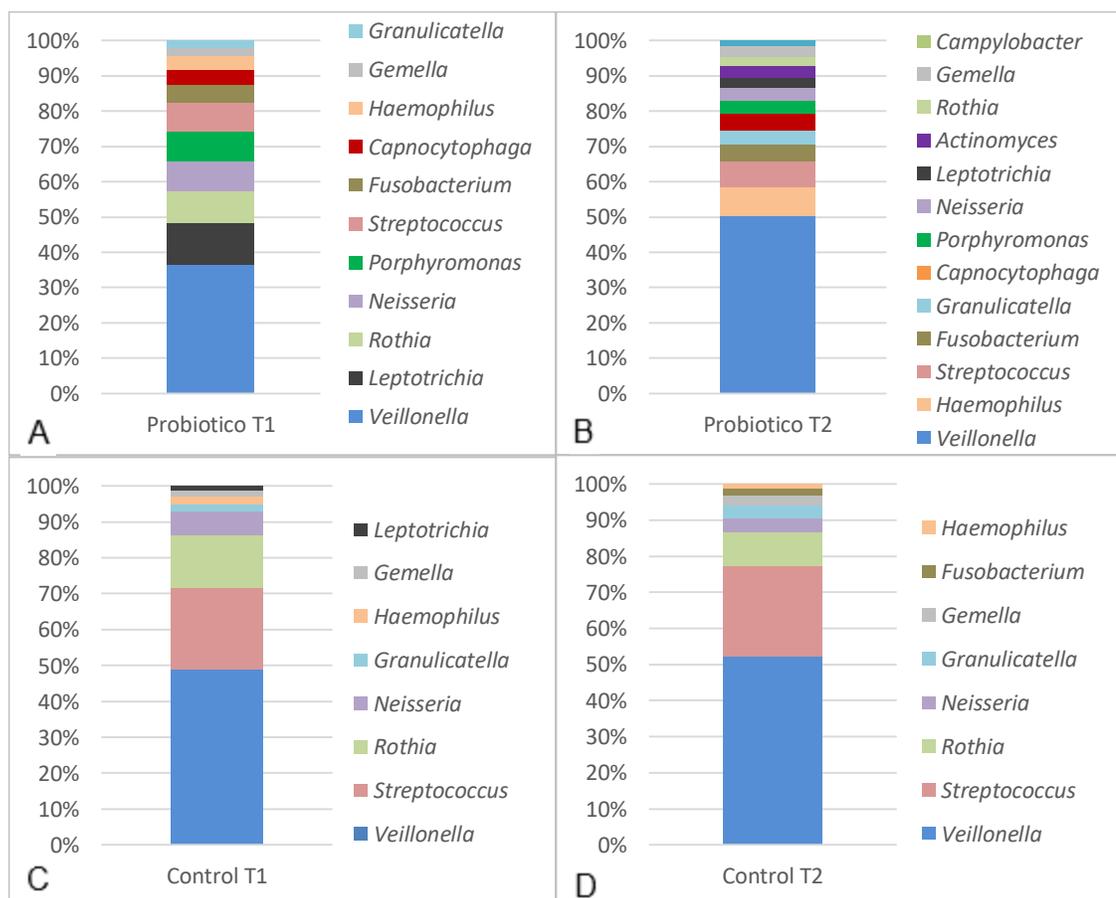


Fig 5: Abundancia de géneros en probiótico T1 (A) y T2 (B), control T1 (C) T2 (D)

en T2 también se encontró 2 géneros que no fueron detectados en T1: *Actinomyces*, asociado a infecciones orales, siendo el más común *A. viscosus* y *Campylobacter* con *C.gracilis* como la especie más abundante del género (datos no presentados). Además, se detectó un cambio en la distribución de los géneros ya existentes, difiriendo así el orden de abundancia en T2 con respecto a T1 (Fig 5). Los géneros que presentaron mayor variación en T2 fueron *Veillonella* (36% /

50%), *Leptotrichia* (12% / 3%), *Rothia* (8% / 3%), *Neisseria* (8% / 4%), *Porphyromonas* (9% / 4%), *Haemophilus* (4% / 8%).

El grupo control que solo fue expuesto a sacarosa presentó una distribución similar de géneros en el tiempo 1 y tiempo 2 (Fig 5 C, D). Sin embargo, fue posible detectar algunas diferencias: El género *Leptotrichia* no fue detectado posterior a la aplicación de sacarosa, mientras que se detectó *Fusobacterium*, presentando como especie dominante a *F. masiliense* (Fig 12). Además, disminuyó el porcentaje de abundancia de *Rothia* (14%/9%). Pese a esto el orden de dominancia de los géneros más abundantes tendió a mantenerse.

5.4. Abundancia de especies

El análisis de abundancia de especie se realizó siguiendo los siguientes criterios: De los géneros más abundantes se consideró solo las especies comprendidas en al menos 95% del género, luego se comparó las especies del tiempo 1 con las del tiempo 2, sin hacer comparaciones cruzadas entre grupos probióticos con controles. De la misma forma, géneros que fueron detectados en tiempo 2 y no estaban en tiempo 1 fueron ignorados. A continuación, se exponen los resultados agrupados.

5.4.1. *Veillonella*

Especie cocácea, Gram negativo agrupada en diplococo, anaeróbica. Se observó que tanto en grupo probióticos como en grupo controles se presentaron múltiples *Veillonella spp.* En el grupo probiótico, se encontraron 4 especies tanto en T1 como en T2, de la misma manera en el grupo control hubo 3 especies en T1 y en T2, la especie dominante en todos los casos fue *V. párvula* (Fig 6).

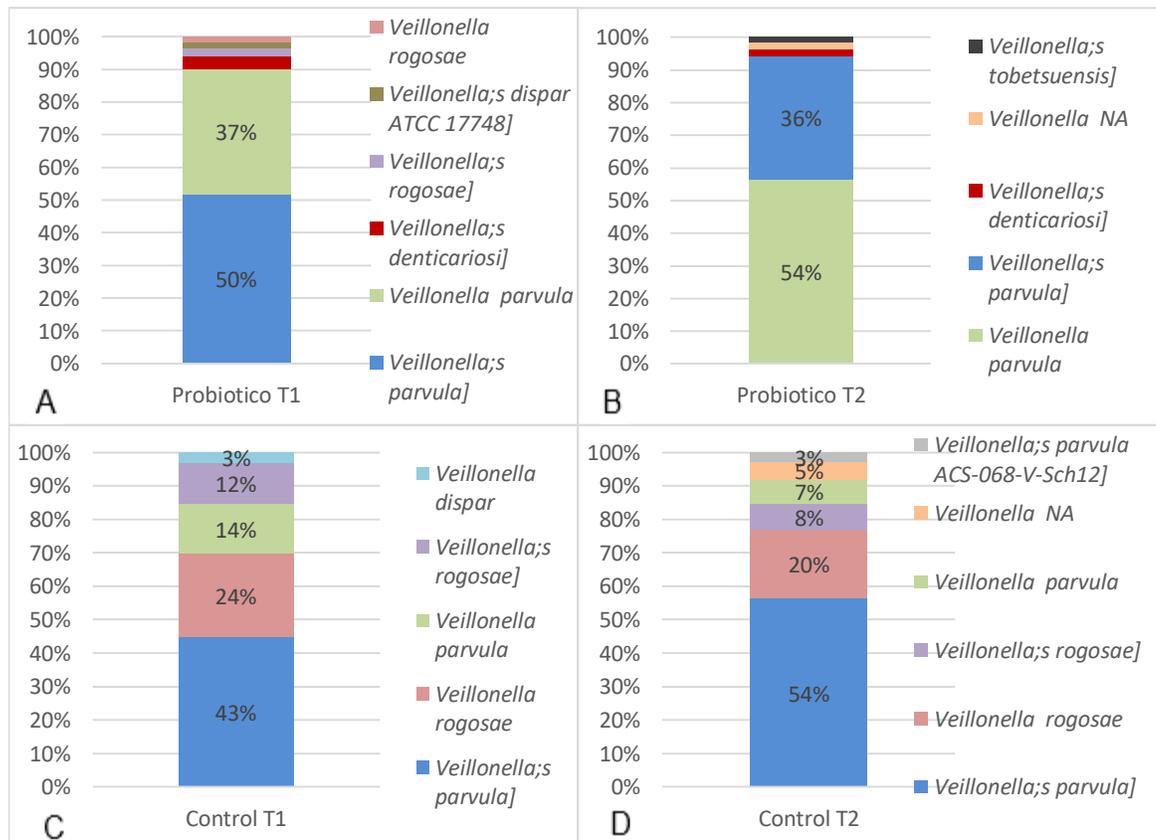


Fig 6: Abundancia de *Veillonella spp* en probiótico T1 (A) y T2 (B), control T1 (C) y T2 (D)

Al finalizar la intervención, en el grupo probiótico, el análisis de abundancia no detectó *V. dispar* ni *V. rogosae* pero, por otro lado, si se detectó *V. tobetsuensis* y *Veillonella NA*. En el T2 del grupo control no se detectó *V. dispar* y en su lugar se detectó *V. NA* (al igual que en el grupo probiótico) además, se apreció un aumento de *V. párvula* y una disminución de *V. rogosae* (Fig 6).

5.4.2. *Leptotrichia*

Especie con forma de bacilo, Gram negativo, anaerobia facultativa, fermentadora y productora de ácido láctico. Tanto en el grupo probiótico como en el grupo control se presentaron múltiples *Leptotrichia spp.* En el grupo probiótico se observó 4 especies en el tiempo 1 y 5 especies en el tiempo 2, al contrario, en el grupo control se observó 4 especies en el tiempo 1 y solo 2 especies en el tiempo 2, la especie dominante en todos los casos fue *L. NA* (Fig 7).

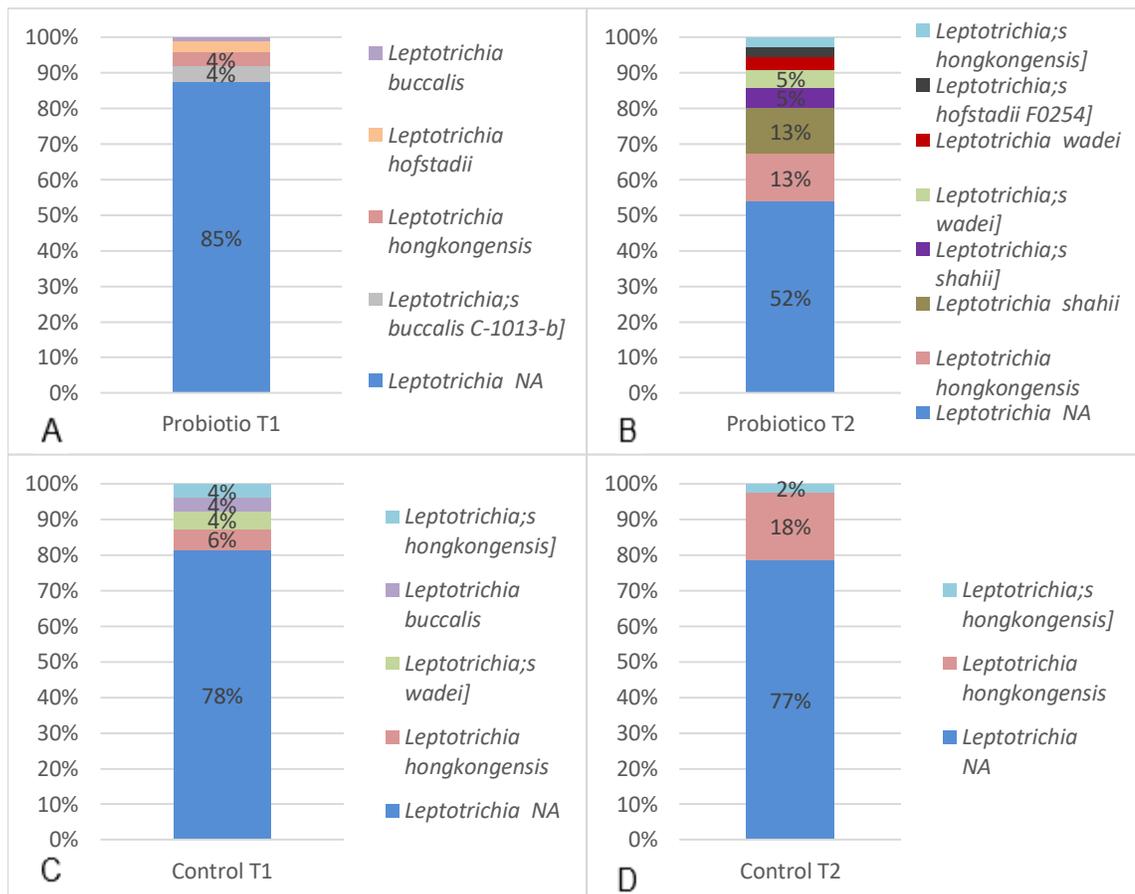


Fig 7: Abundancia de *Leptotrichia spp* en probiótico T1 (A) y T2 (B), control T1 (C) y T2 (D)

Con relación a la abundancia de especies, en el grupo probiótico se dejó de detectar *L. buccalis* en el tiempo 2 pero se detectó *L. wadei* y *L. shahii*. También se observó el aumento de *L. hongkongensis* de un 4% a 16%, de *L. NA* y de *L. hofstadii* (Fig 7).

En el grupo control, en el T2 no fue posible detectar *L. wadei* y *L. buccalis*, sin embargo, *L. hongkongensis* duplicó su porcentaje de detección.

5.4.3. *Porphyromonas*

Especie de morfología cocobacilar, Gram negativo, anaeróbico y asacarolítico. El género *Porphyromonas* en el grupo probiótico se ubicó dentro del 95% de los géneros más abundantes analizados, contrariamente en el grupo control se encontró en el 5% menos abundante. Se observó que tanto en probióticos T1 como en controles T2 se presentó una única especie, mientras que en probiótico T2 y controles T1, se presentaron dos especies (comportamiento contrario entre controles y probióticos). La especie dominante del orden superior al 90% fue *P. pasteri* (Fig 8).

En el grupo probiótico T2 detectamos *P. catoniae* en un 10% de abundancia mientras que en el grupo control T1 se detectó *P. catoniae* en un 2% (Fig 8).

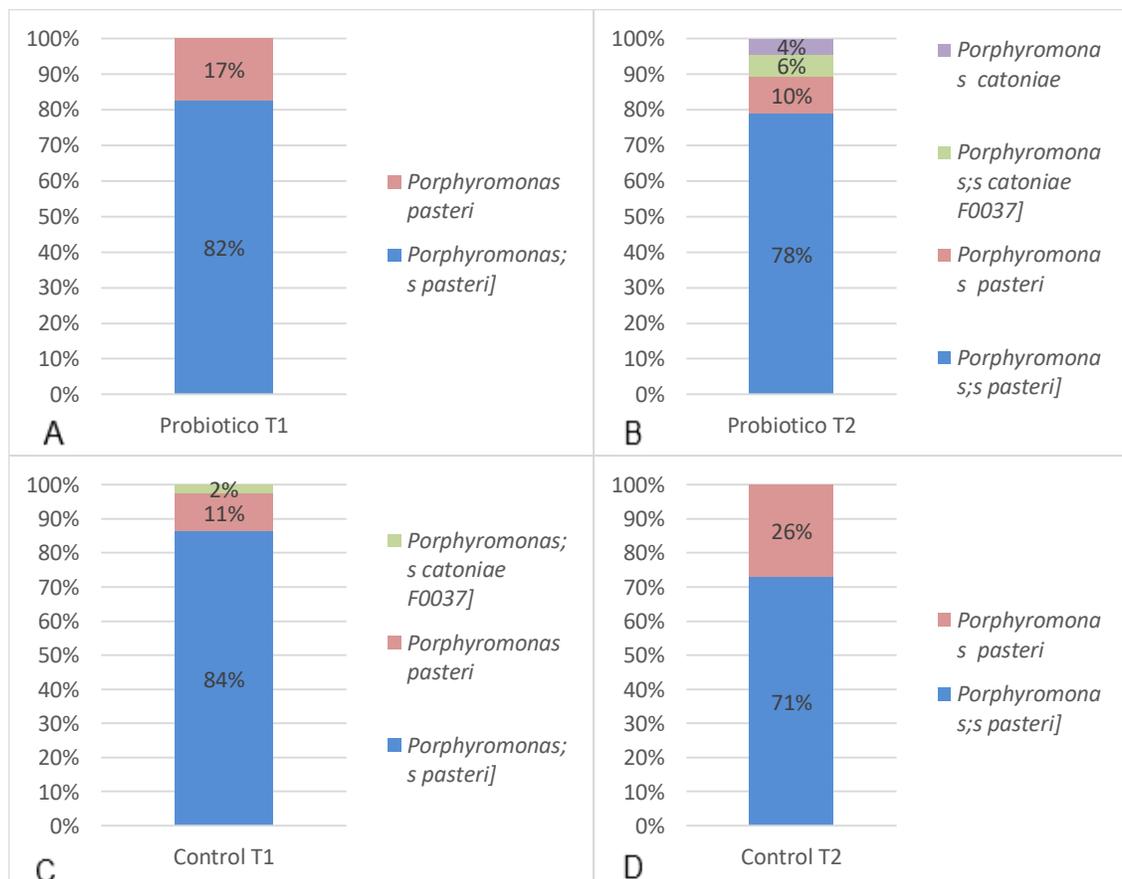


Fig 8: Abundancia de *Porphyromonas* spp en probiótico T1 (A) y T2 (B), control T1 (C) y T2 (D)

5.4.4. *Neisseria*

Especie cocácea, Gram negativo, agrupada en diplococos. Se observó que tanto en el grupo probiótico como en el grupo control se presentaron múltiples *Neisseria spp.* En el grupo probiótico se observó 5 especies tanto en T1 como en T2, así mismo, en el grupo control hubo las mismas 3 especies antes y después de la aplicación de sacarosa. La especie dominante resultó ser *N. lactamica*, exceptuando el grupo control tiempo 2 donde la especie dominante fue *N. flavescens* con una abundancia del 67% (Fig 9).

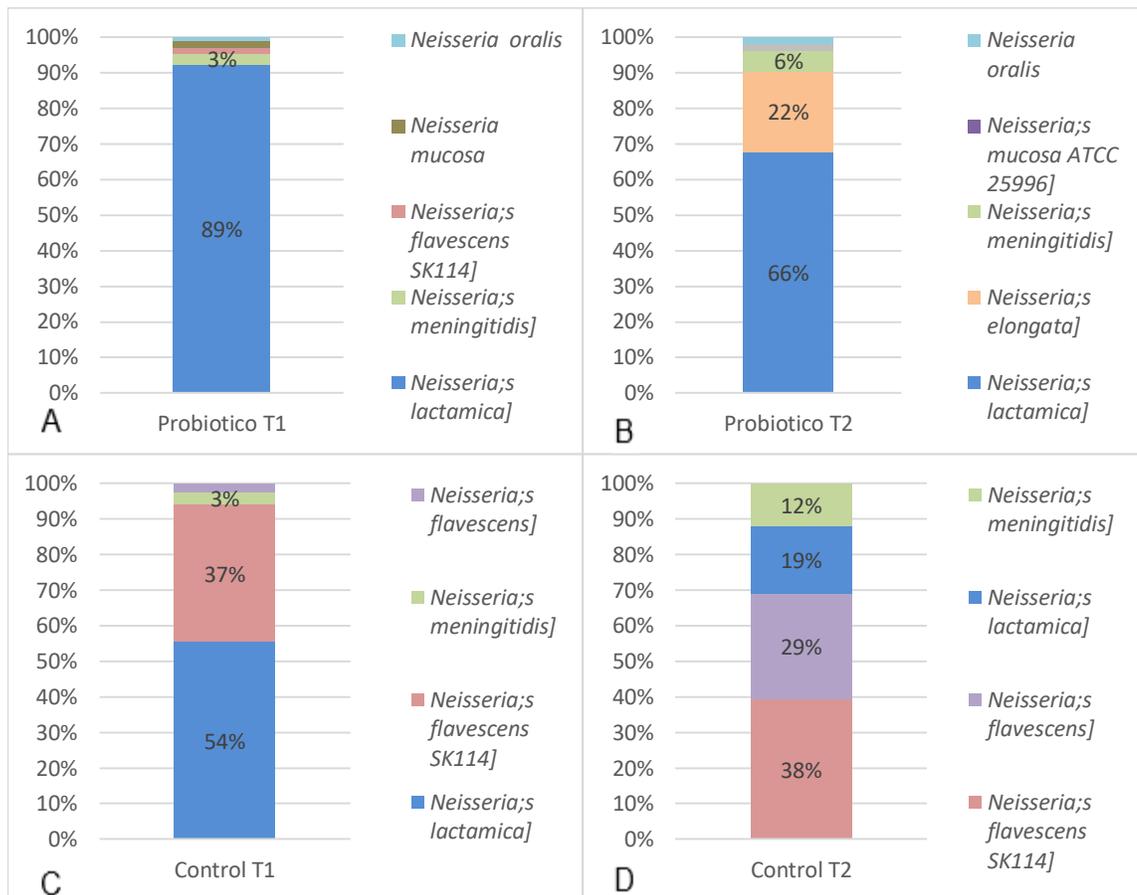


Fig 9: Abundancia de *Neisseria spp* en probiótico T1 (A) y T2 (B), control T1 (C) y T2 (D)

Al finalizar el tratamiento, en el grupo probiótico, analizando la abundancia no se detectó *N. flavescens* pero si se detectó *N. elongata*. También se pudo observar un aumento de *N. meningitidis* y, por otro lado, una disminución de *N. lactamica* de 89% a un 66% (Fig 9).

En el grupo control luego de la exposición a sacarosa, aumenta *N. meningitidis* en conjunto con *N. flavescens* de un 39% a un 67% de abundancia, por otro lado, disminuye *N. lactamica* de un 54% a un 19% de abundancia (Fig 9).

5.4.6. *Rothia*

Especie bacilar, Gram positivo, aeróbica. Tanto en el grupo probiótico como en el grupo control se presentó múltiples *Rothia spp.* En el grupo probiótico como en el grupo control se observó 3 especies en tiempo 1 que se repiten en tiempo 2. Las especies dominantes en probióticos fueron *R. mucilagenosa* seguido por *R. dentocariosa*, en cambio, en los controles la especie dominante fue *R. dentocariosa* seguido por *R. mucilagenosa* (Fig 10).

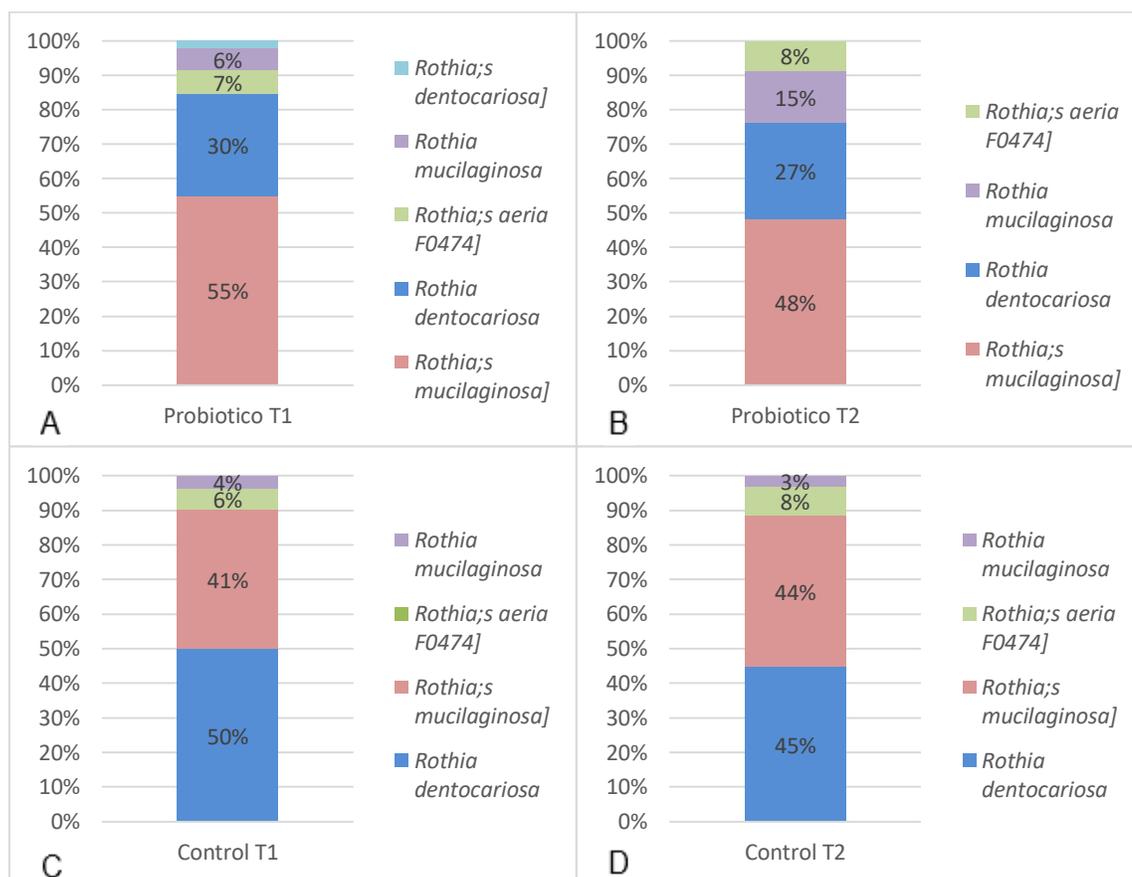


Fig 10: Abundancia de *Rothia spp* en probiótico T1 (A) y T2 (B), control T1 (C) y T2 (D).

En tiempo 2 del grupo probiótico, en cuanto a la abundancia, hubo un aumento de *R. mucilagenosa* y de *R. aeria*, sin embargo *R. dentocariosa* disminuyó. En el

grupo control se presentó una disminución de *R. dentocariosa* mientras que las especies *R. mucilagenosa* y *R. aeria* evidenciaron un aumento (Fig 10).

5.4.7. *Streptococcus*

El género *Streptococcus* es un grupo de bacterias formado por cocáceas Gram positivo, pertenecientes al *Phylum Firmicutes* y al grupo de las bacterias ácido lácticas. Estas bacterias crecen en cadenas o pares, la mayoría de las especies de *Streptococcus* son anaerobios facultativos, como especie suele ser heterogénea y su rol en el ecosistema también es diverso, variando desde un rol protector como regulador del pH local a un rol cariogénico debido a la capacidad acidogénica de algunas especies del género. Entre los *Streptococcus* detectados en este estudio encontramos especies productoras de ácidos débiles tales como: *S. oralis*, *S. mitis* y *S. gordonii*. Además de especies alcalogénicas entre las cuales se encuentran a *S. cristatus*, *S. sanguinis* y *S. parasanguinis* (Fig 11).

En el grupo probiótico se observó 5 especies antes de la intervención y 6 especies después. Al contrario, en el grupo control, se encontró 5 especies en tiempo 1 y solo 4 en tiempo 2, la especie dominante en todos los grupos fue *S. oralis* (Fig 11).

En el tiempo 2 del grupo probiótico, en el análisis de abundancia, no se detectó *S. lactarius*, en cambio, sí se detectó *S. gordonii* y *S. parasanguinis*, *S. cristatus* disminuyó junto con *S. oralis* (de un 60% a un 47%), sin embargo, *S. sanguinis* y *S. mitis* aumentaron. En este grupo aumentaron las especies alcalogénicas aumentaron en un 10% (Fig 11).

En el grupo control en el tiempo 2, no se detectó *S. pneumoniae*, ni *S. sanguinis* pero sí se detectó *S. parasanguinis*, por otro lado, aumentó *S. oralis* en conjunto con una disminución de *S. mitis* (Fig 11).

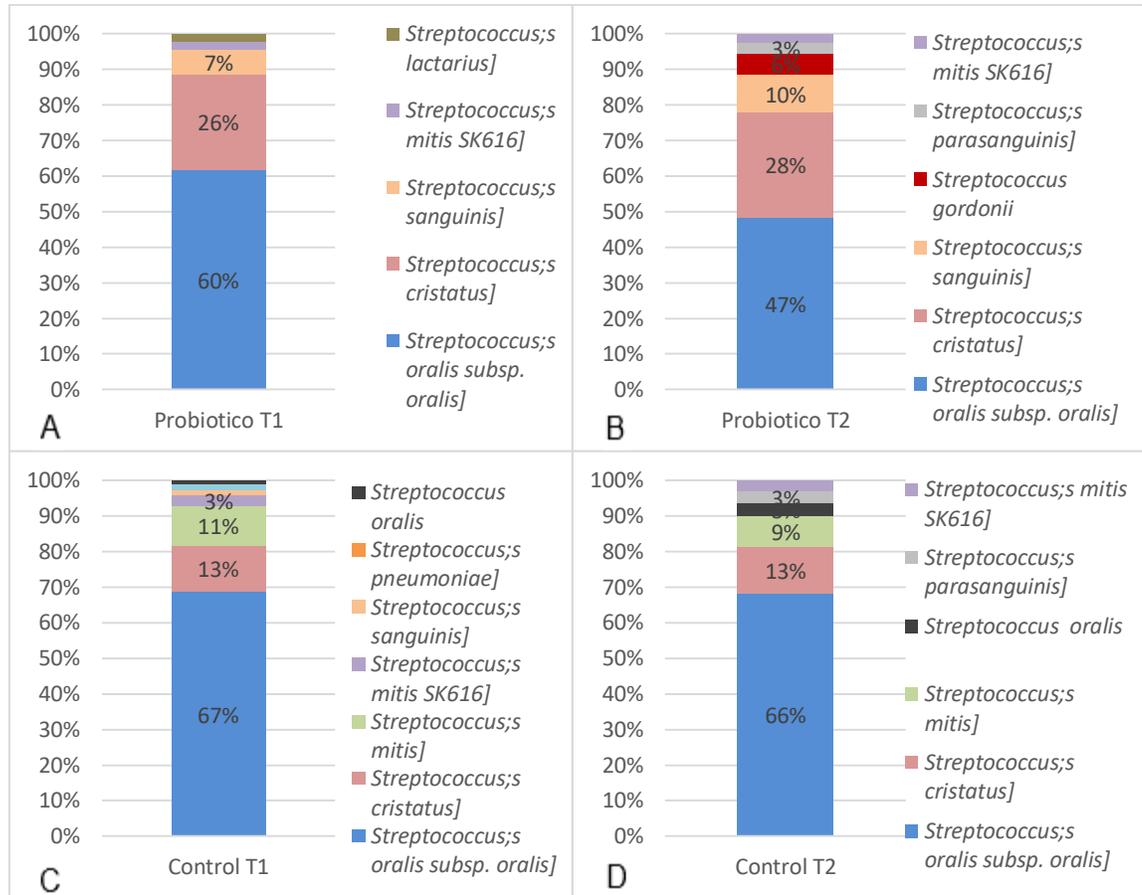


Fig 11: Abundancia de *Streptococcus spp* en probiótico T1 (A) y T2 (B), control T1 (C) y T2 (D).

5.4.8. *Fusobacterium*

Especie de morfología bacilar fusiforme, Gram negativo, anaeróbica. El género *Fusobacterium* en el grupo probiótico, se encontró dentro del 95% de los géneros más abundantes analizados, contrariamente, en el grupo control se encontró en el 5% menos abundante. Se observó que tanto en probióticos como en controles se presentan múltiples *Fusobacterium spp*. En el grupo probiótico en el T1 se detectó 3 especies que se repiten en el tiempo 2, al contrario, en el grupo control se observó 2 especies en el tiempo 1 y 3 especies en el tiempo 2, la especie dominante varió por grupo y por tiempo, en probiótico T1 y control T1 se detectó como dominante a *F. periodonticum*, en probiótico T2 fue *F. nucleatum* y finalmente en control T2 se observó *F. masiliense* (Fig 12).

La abundancia del grupo probiótico presentó variaciones, al tiempo 2, disminuye *F. periodonticum* de un 61% a un 5% de detección, sin embargo, aumentó tanto *F. nucleatum* (de un 24% a un 65%) como *F. hwasookii* (Fig 12).

En el grupo control luego de la exposición a sacarosa, no se observó *F. periodonticum*, pero si se detectaron *Fusobacterium NA* y *F. masiliense*, además se observó disminución de *F. nucleatum* (Fig 12).

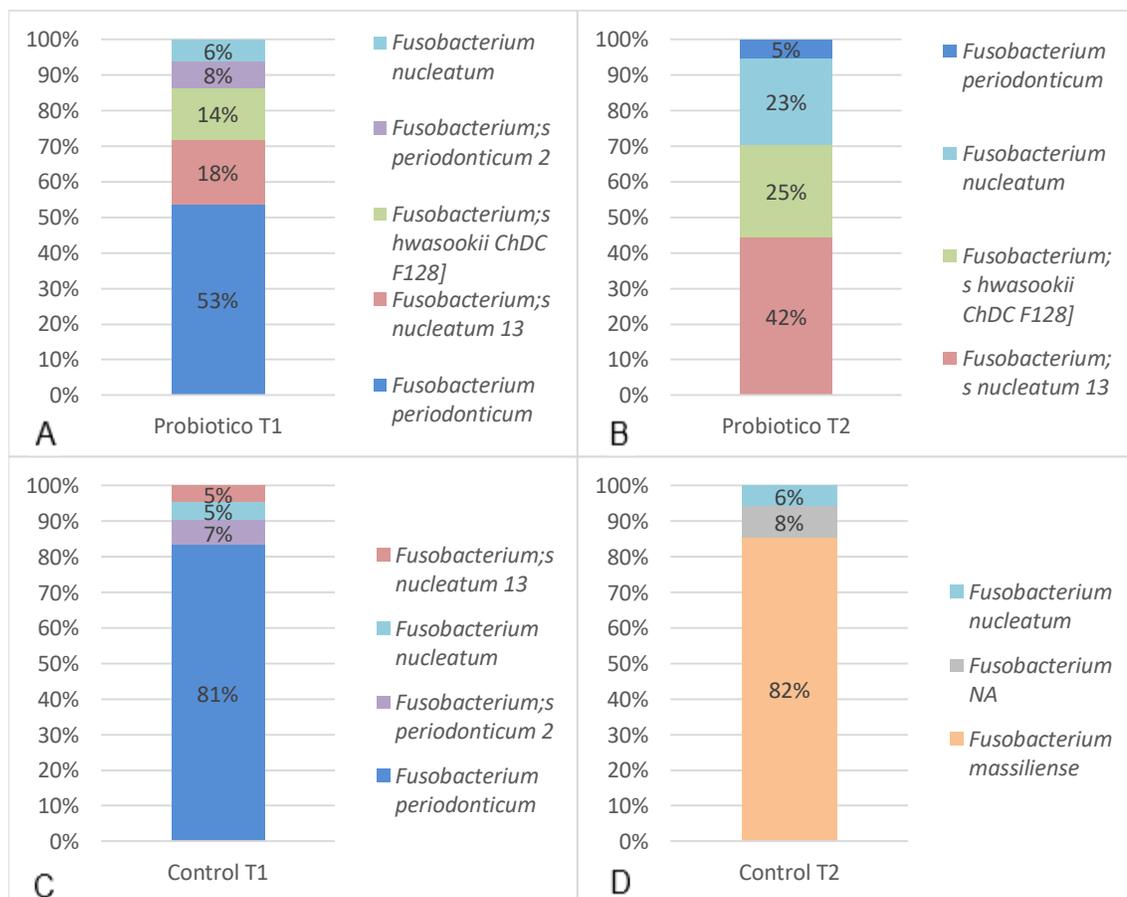


Fig 12: Abundancia de *Fusobacterium* spp en probiótico T1 (A) y T2 (B), control T1 (C) y T2 (D).

5.4.9. *Haemophilus*

Especie cocobacilar, Gram negativo, anaeróbico. Tanto en grupo probiótico como en control se detectó múltiples *Haemophilus spp.* En el grupo probiótico 2 especies se mantienen tanto en T1 como en T2, similarmente, en el grupo control se observó 3 especies en T1 que se conservan en T2, la especie dominante en todos los casos fue *H. influenzae* (Fig 13).

En el grupo probiótico, en la diversidad, se observó un aumento de *H. influenzae*, y una disminución de *H. parainfluenzae* en el tiempo 2. Contrariamente, el grupo control presentó una disminución de *H. influenzae* y un aumento de *H. parainfluenzae* (Fig 13).

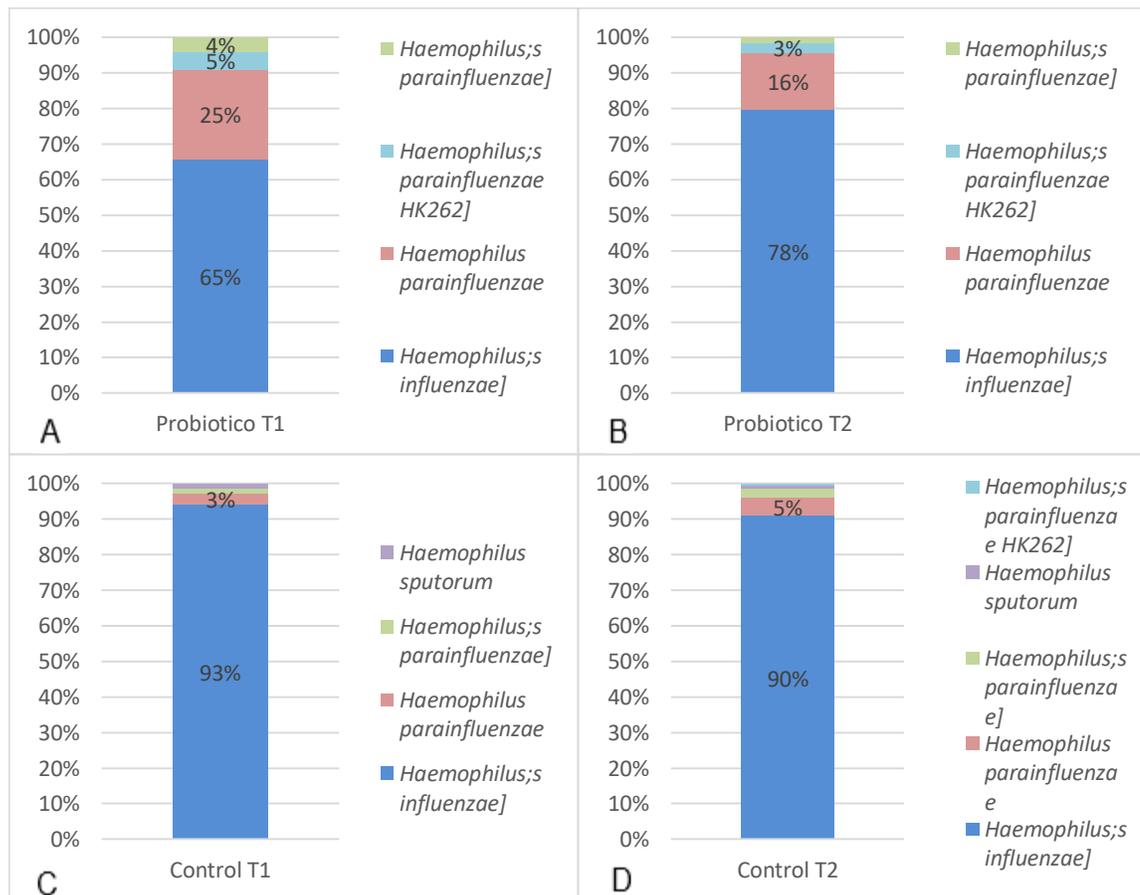


Fig 13: Abundancia de *Haemophilus spp.* en probiótico T1 (A) y T2 (B), control T1 (C) y T2 (D).

5.4.10. *Capnocytophaga*

Especie fusiforme, Gram negativo, anaerobia facultativa, capnofílica. En el grupo probiótico el género *Capnocytophaga* se encontró dentro del 95% de los géneros más abundantes analizados, mientras que en el grupo control se encontró en el 5% menos abundante.

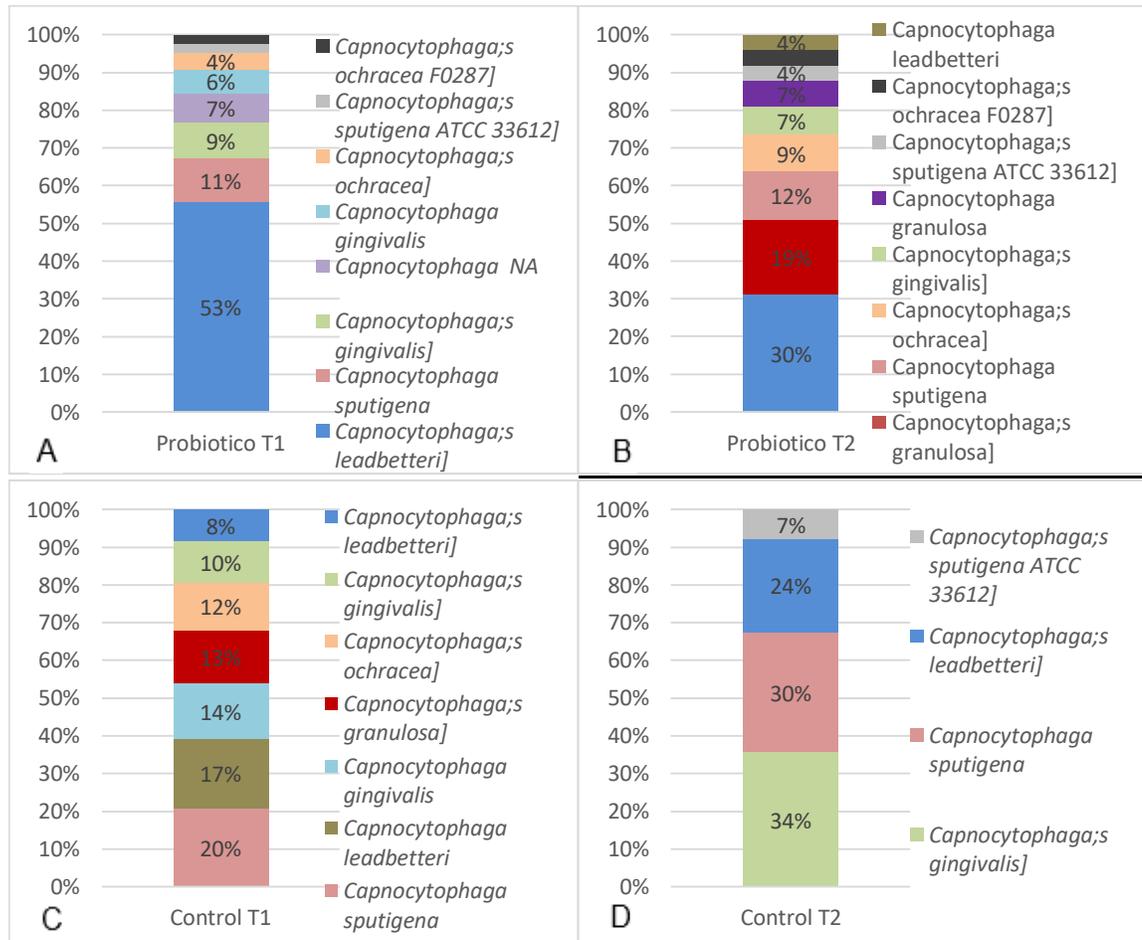


Fig 14: Abundancia de *Capnocytophaga* spp en probiótico T1 (A) y T2 (B), control T1 (C) y T2 (D).

Se observó que tanto en el grupo probiótico como en el grupo control se presentaron múltiples *Capnocytophaga* spp. En el grupo probiótico se observaron 4 especies en el tiempo 1, sin embargo, se observó 5 especies en el tiempo 2, al contrario, en el grupo control se detectó 5 especies en el tiempo 1 y solo 3 especies en el tiempo 2, la especie dominante varió por grupo y por tiempo, en probiótico y control T1, se detectó como dominante a *C. leadbetteri*, en probiótico T2 fue *C. granulosa* y finalmente en control T2 se observó. *C. sputigena* (Fig 14).

En el grupo probiótico, luego de finalizado el estudio, no se detectó *C. NA*, pero sí se detectó *C. granulosa*. Además, disminuyeron 2 especies, *C. leadbetteri* de 55% a 30% y *C. gingivalis*, sin embargo, aumentaron *C. sputingea* y *C. ochracea* (Fig 14). En el grupo control, posterior a la exposición a sacarosa, no se detectó *C. granulosa* ni *C. ochracea*, además, se apreció una disminución de *C. leadbetteri* mientras que aumentó tanto *C. sputingea* como *C. gingivalis* (Fig 14).

5.4.11. *Gemella*

Especie cocácea Gram positivo, agrupada en pares, anaeróbica facultativa. Tanto en el grupo probiótico como en el grupo control se presentan múltiples especies del género *Gemella*. En el grupo probiótico se observó 3 especies tanto en T1 como T2, por otro lado, en el grupo control se observó 4 especies en T1 y solo 3 en T2, la especie dominante en el grupo probiótico en T1 fue *G. sanguinis*, mientras que en T2 fue *G. morbillorum*, en cambio en el grupo control se mantuvo como dominante *G. haemolysans* (Fig 15).

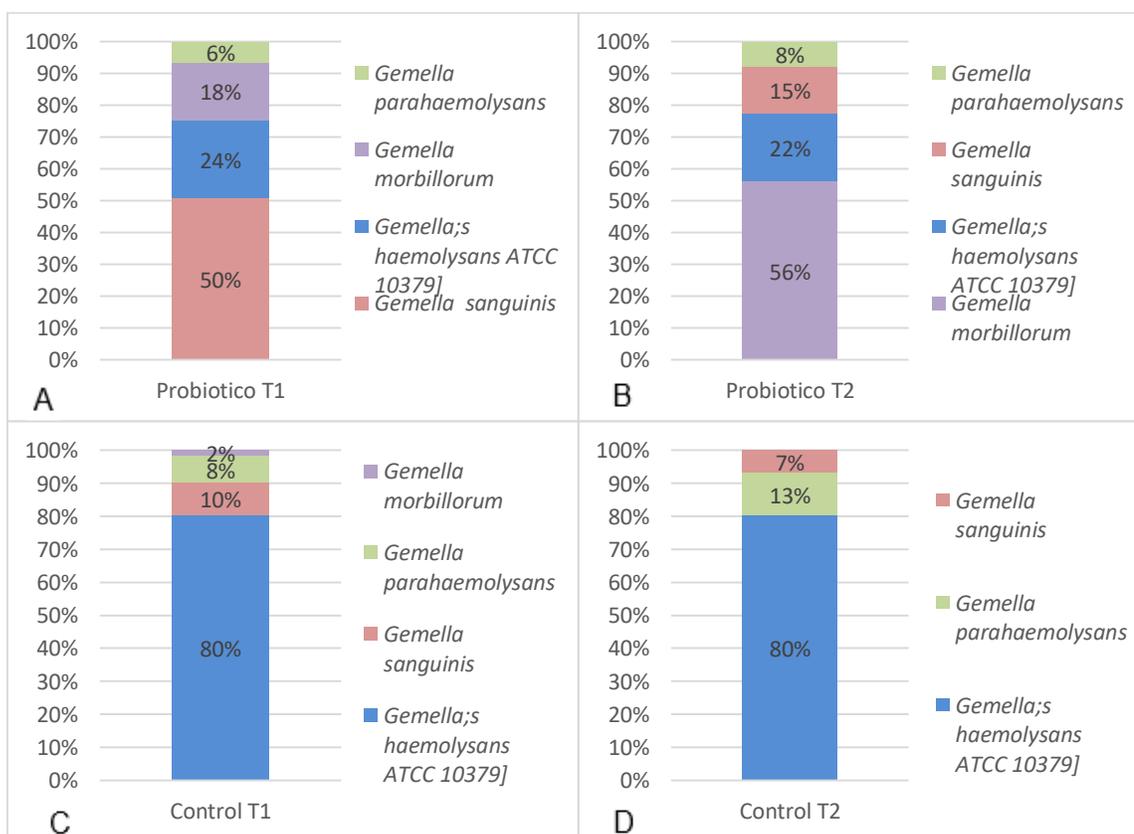


Fig 15: Abundancia de *Gemella* spp en probiótico T1 (A) y T2 (B), control T1 (C) y T2 (D).

En el grupo probiótico, en cuanto a la abundancia, en el tiempo 2 disminuye, *G. haemolysans* y *G. sanguinis* de un 50% a un 15%, por otro lado, aumentan tanto *G. parahaemolysans* como *G. morbillorum* de un 18% a un 56% (Fig 15).

En el grupo control, luego de la exposición a sacarosa no se detecta *G. morbillorum*. Adicionalmente, disminuye *G. sanguinis* pero aumenta *G. parahemolysans* (Fig 15).

5.4.12. *Granulicatella*

Especie cocácea Gram negativo, agrupada en cadenas, anaeróbica. En el grupo probiótico y en el grupo control se presentan múltiples *Granulicatella spp.* En ambos grupos se observó 2 especies en T1 las cuales se mantienen para el T2. La especie dominante en todos los grupos fue *G. adiacens* en el orden mayor del 90% (Fig 16).

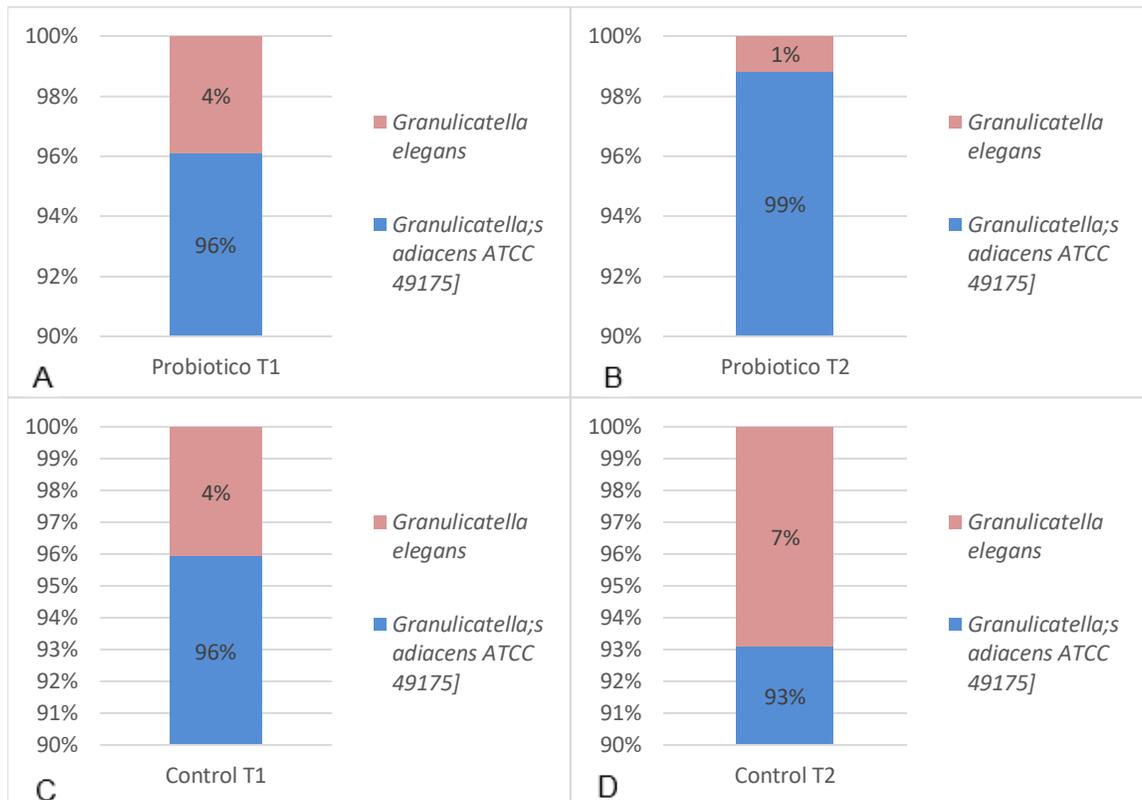


Fig 16: Abundancia de *Granulicatella spp.* en probiótico T1 (A) y T2 (B), control T1 (C) y T2 (D).

5.5. Diversidad de género

Para el análisis de la diversidad se utilizó tanto los índices de Shannon y Simpson como el N° de OTUS. En el tiempo 1 al comparar los resultados del grupo probiótico con control se aprecia que tanto el índice de Shannon como el de Simpson

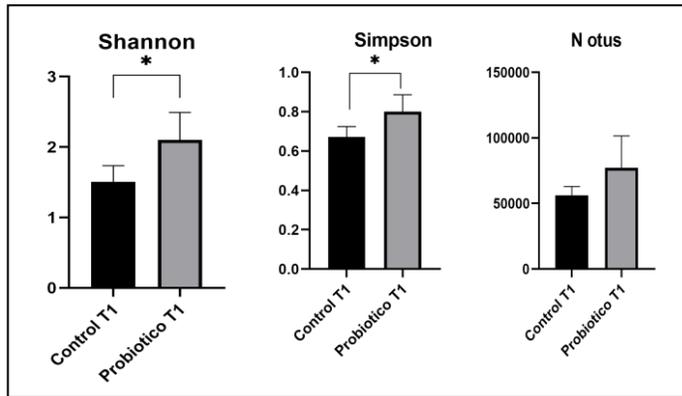


Fig 17: Índices de diversidad y N° de OTUS entre grupos probiótico T1 y control T1.

son mayores en el grupo probiótico (Fig 17), es decir, este grupo presenta mayor diversidad, cabe destacar que esta diferencia fue estadísticamente significativa, al observar el N° OTUS este también es mayor en el grupo probiótico sin embargo no presenta diferencia significativa (Fig 17), estos datos nos indican que los grupos control y probióticos son distintos en un inicio.

Al comparar los resultados del grupo probiótico en T1 con T2, se observó que los índices de Shannon y Simpson

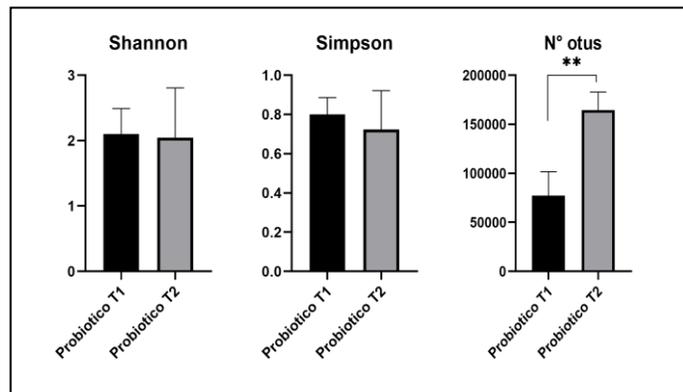


Fig 18: Índices de diversidad y N° de OTUS entre grupos probiótico T1 y T2.

disminuyeron levemente sin ser esta diferencia significativa, por otro lado, el N° de OTUS se duplicó, siendo este aumento estadísticamente significativo (Fig 18). Al comparar los resultados del grupo control previo a la intervención con los

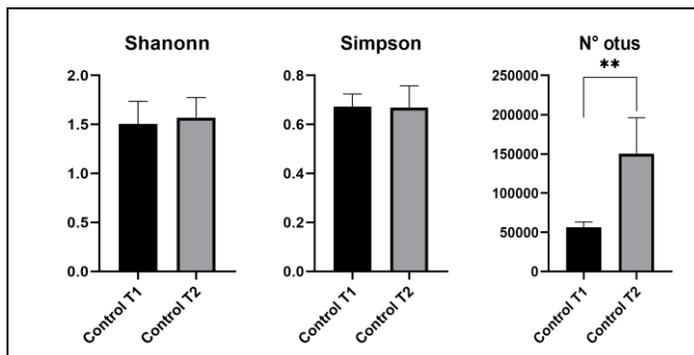


Fig 19: Índices de diversidad y N° de OTUS entre grupos control T1 y T2.

resultados posterior a la exposición a sacarosa, se observó que el índice de Shannon aumento levemente y, por el contrario, el índice de Simpson disminuyo levemente, ambos casos sin arrojar una

diferencia significativa (Fig 19), sin embargo, el N° de OTUS se triplico presentando una diferencia significativa (Fig 19). Estos datos sugieren que no hubo un cambio significativo en la diversidad, pero si en la cantidad.

Para analizar los grupos probiótico T2 y control T2 se comparó el delta (diferencia

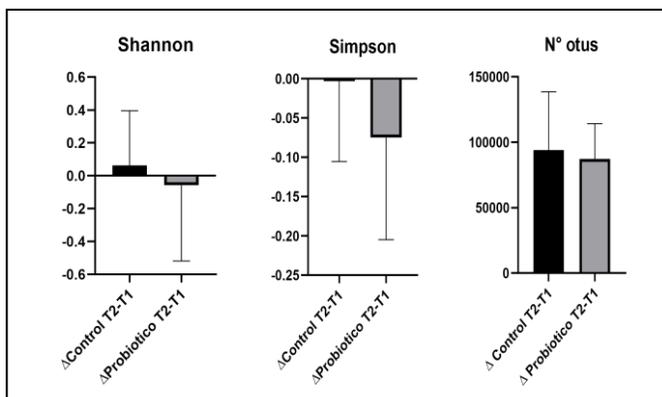


Fig 20: Diferencia (T2- T1) de Índices de diversidad y N° de OTUS entre grupos probiótico y control.

de resultados entre T2 y T1) de los índices previamente mencionados y del N° de OTUS (Fig 20), en los resultados se evidencia que el índice de Shannon presentó tendencias contrarias en el grupo probiótico (tendió a aumentar) y en el grupo control (tendió a disminuir) sin embargo la diferencia no fue estadísticamente

significativa, por otro lado el índice de Simpson se comportó igual en ambos grupos (tendió a disminuir levemente) nuevamente sin ser la diferencia significativa y finalmente el N° OTUS aumentó en ambos grupos de manera similar sin que la diferencia en aumento fuese significativa (Fig 20), ambos grupos crecieron la misma cantidad de OTUS, lo cual indica que un grupo duplicó mientras que otro triplicó su tamaño.

5.6. Diversidad de especie

El grupo probiótico T1 se compara con el grupo control T1 (Fig 21), al igual que en el caso de diversidad de género, se observó que tanto los índices de Shannon y Simpson son mayores en el grupo probiótico siendo esta diferencia significativa,

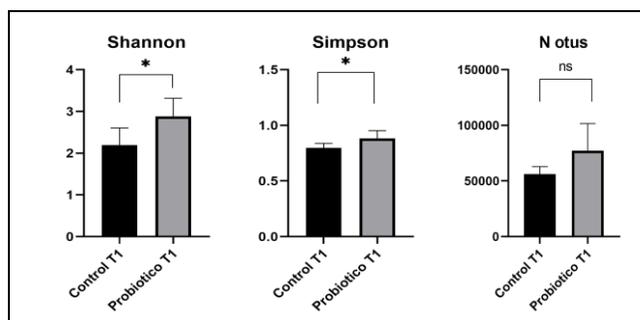


Fig 21: Índices de diversidad y N° de OTUS de especies entre grupos probiótico T1 y control T1.

sin embargo, no marca diferencia estadística (Fig 21). Estos datos demuestran que a nivel de especie los grupos también son diferentes en un inicio.

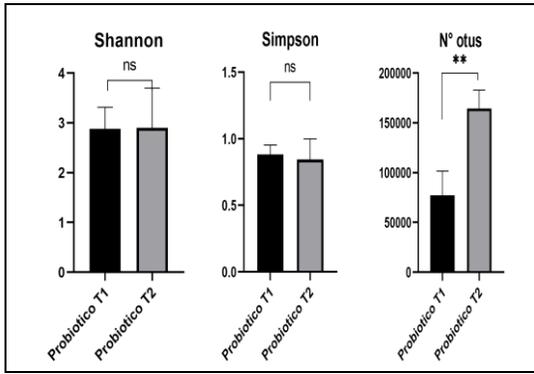


Fig 22: Índices de diversidad y N° de OTUS de especies entre grupos probiótico T1 y T2.

Al comparar el grupo probiótico al inicio y al final de la intervención (fig 22), el índice de Shannon aumenta levemente mientras que el de Simpson disminuye levemente, ninguno de estos cambios presentó diferencia significativa. Por otro lado, el N° de OTUS aumentó, presentando diferencia estadísticamente significativa (Fig 22).

Luego, al comparar el grupo control en T1 y T2, se observó que tanto los índices de Shannon como el de Simpson aumentaron levemente, sin marcar nuevamente una diferencia estadística, mientras que el N° de OTUS presentó un aumento estadísticamente significativo (Fig 23).

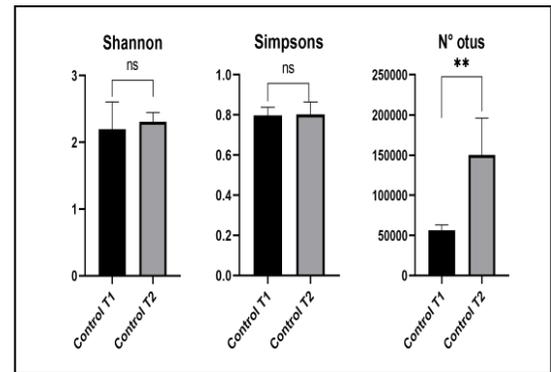


Fig 23: Índices de diversidad y N° de OTUS de especies entre grupos probiótico T1 y T2.

Para analizar los grupos probiótico T2 y control T2 se comparó el delta (diferencia entre T2 y T1) de los índices y del N° de OTUS (Fig 24), en los resultados se evidencia que el índice de Shannon se comportó igual en ambos grupos (tendió a aumentar) sin ser la diferencia significativa, sin embargo, el índice de Simpson presentó tendencias contrarias en el grupo probiótico (tendió a disminuir) y en el grupo control (tendió a aumentar) aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa y finalmente el N° OTUS aumentó en ambos grupos de manera similar sin ser la diferencia significativa (Fig 24), indicando que ambos grupos crecieron de manera similar.

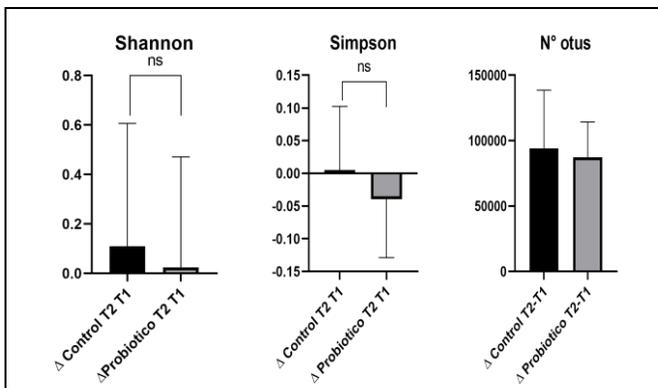


Fig 24: Diferencia (T2 - T1) de Índices de diversidad y N° de OTUS entre grupos probiótico y control.

grupo control (tendió a aumentar) aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa y finalmente el N° OTUS aumentó en ambos grupos de manera similar sin ser la diferencia significativa (Fig 24), indicando que ambos grupos crecieron de manera similar.

5.6.1. Diversidad en especies específica

Se analizaron los índices de diversidad de las especies previamente seleccionadas en el punto 5.3, Los índices de Shannon y Simpson fueron aplicados para analizar la diversidad entre T1 y T2 en el grupo probiótico y el grupo control.

Probióticos

La diversidad para las especies estudiadas luego de la intervención con la especie probiótica en algunos casos aumentó (*Leptotrichia* y *Streptococcus spp.*) a diferencia de otros, en los cuales disminuyó (*Veillonella* y *Fusobacterium spp.*) (Fig 25). Sin embargo, en ninguno de los casos las diferencias resultaron ser estadísticamente significativas.

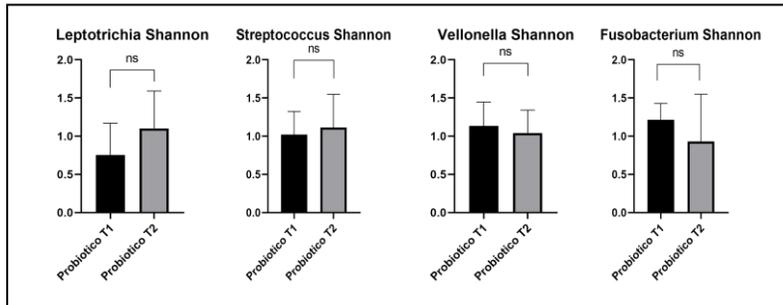


Fig 25: Ejemplos de índices de diversidad de cada genero por separado en grupo probiótico T1 y T2.

Controles

Los índices de Shannon y Simpson para las especies de *Veillonella*, *Streptococcus*, *Rothia*, *Neisseria*, *Granulicatella*, *Haemophilus*, *Gemella* y *Leptotrichia* marcaron una tendencia a aumentar (Fig 26) sin presentar modificaciones estadísticamente significativas.

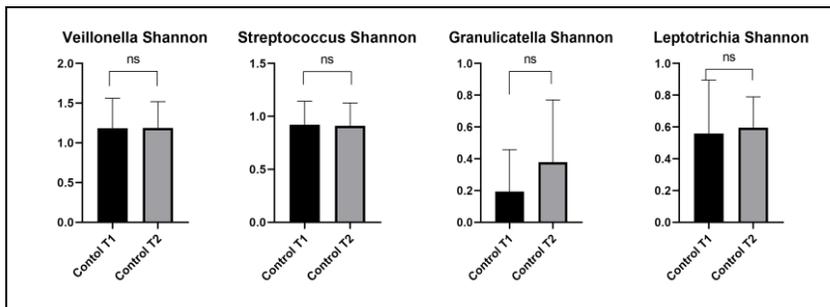


Fig 26: Ejemplos de índices de diversidad de cada genero por separado en grupo control T1 y T2.

5.6.1.2 N° de OTUS de especies

Probióticos

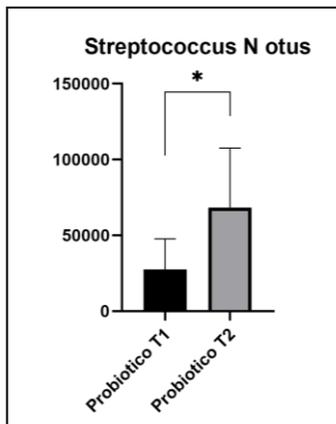


Fig 27: N° de OTUS *Streptococcus* spp en grupo probiótico.

El análisis del N° de OTUS se realizó bajo los mismos criterios que los índices de Shannon y Simpson. En el grupo probiótico se observó que *streptococcus* presentó un aumento de N° de OTUS (Fig 27), el cual fue estadísticamente significativo, por otro lado, *Leptotrichia*, *Rothia*, *Fusobacterium*, *Capnocytophaga*, *Gemella* y *Granulicatella* mostraron tendencia a aumentar (Fig 28) sin que estas diferencias sean estadísticamente significativas, por el contrario, *Veillonella*, *Porphyromonas*,

Neisseria y *Haemophilus* marcaron una tendencia a disminuir su N° de OTUS (Fig 28) sin presentar diferencia estadística.

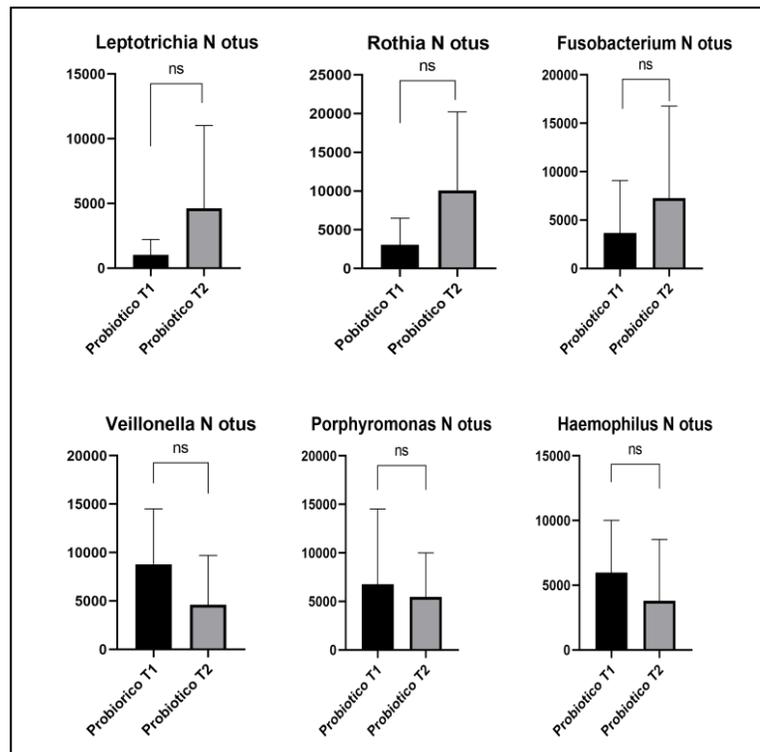


Fig 28: Ejemplos de N° de OTUS en grupo probiótico.

Controles

En el grupo control, el N° de OTUS de *Streptococcus* y *Rothia* presentaron un aumento el cual fue estadísticamente significativo (Fig 29). Mientras que *Veillonella*, *Neisseria*, *Granulicatella*, *Haemophilus*, *Gemella* y *Porphyromonas* mostraron tendencia a aumentar sin generar diferencia

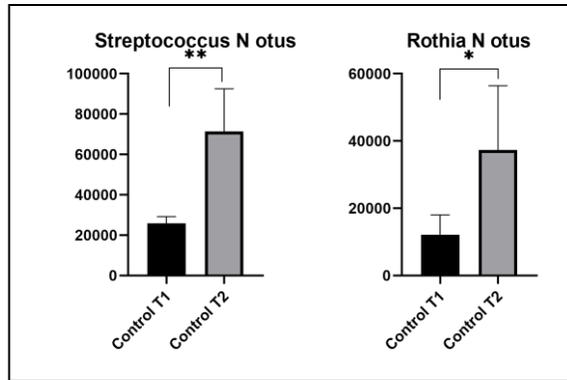


Fig 29: N° de OTUS *Streptococcus* spp y *Rothia* spp en grupo control.

estadística (Fig 30), al contrario, *Leptotrichia* y *Capnocytophaga* presentaron una leve disminución sin ser estadísticamente significativa (Fig 30).

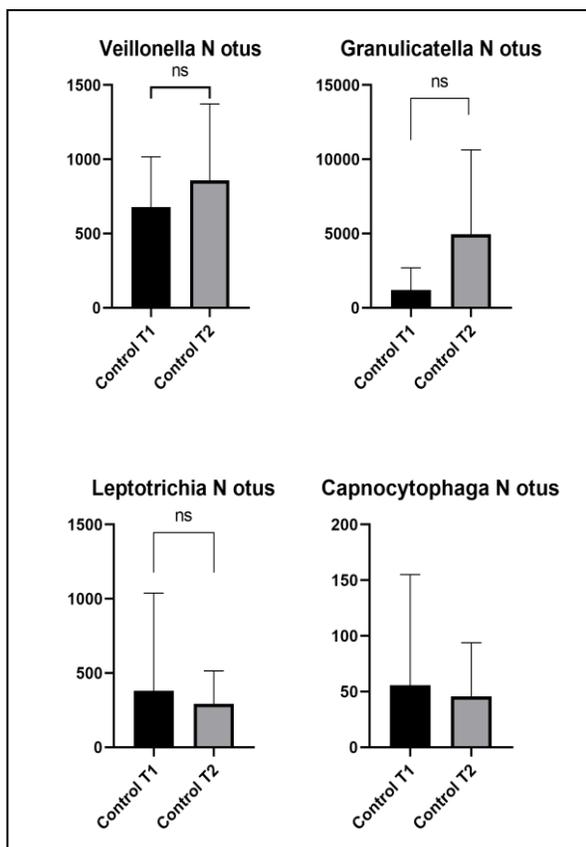


Fig 30: Ejemplos de N° de OTUS en grupo control.

6. Discusión

Los probióticos son microorganismos vivos considerados beneficiosos para el hospedero y se han usado durante las últimas décadas para tratar enfermedades gastrointestinales, así mismo, en los últimos años se ha estudiado su potencial para tratar la enfermedad de caries. Múltiples estudios en personas han sugerido que los probióticos son un tratamiento legítimo para la enfermedad de caries (Cagetti *et al.*, 2013, Teughels *et al.*, 2008, Rodriguez *et al.*, 2016, Seminario-Amez *et al.*, 2017, Pahumunto *et al.*, 2018). La mayoría de los estudios sobre el efecto de los probióticos en la enfermedad de caries evalúan marcadores subrogantes para caries y son pocos estudios que han usado como marcador la progresión o aparición de nuevas lesiones (Gruner y Paris, 2016), por otro lado, ninguno de los estudios antes mencionados ha logrado explicar el mecanismo de acción de los probióticos, lo cual nos deja una interrogante que hasta el momento no ha podido ser respondida. Este estudio se centra en el análisis del microbioma de un modelo *in situ* de caries expuesto a probióticos a través de un análisis “*high-throughput sequencing*”, lo cual según nuestro conocimiento sería el primer proyecto de este tipo aplicado a probióticos, con este trabajo esperamos comenzar a dilucidar el efecto tóxico del probiótico y su utilidad para tratar las caries.

Esta investigación fue realizada en voluntarios que presentaron tanto edad (18 a 29 años) como niveles de salud oral y actividad similares. Diversos estudios con modelos *in situ* se han realizado en el área de odontología y en la mayoría no se explicita la ocupación de los participantes, en los estudios que sí se menciona la ocupación en casi todos los casos los voluntarios han sido estudiantes o docentes de odontología (Young-Hye Sung *et al.*, 2014), la principal diferencia entre nuestros grupos es que el grupo probióticos se encontraba en Santiago mientras que el grupo control se encontraba en la ciudad de Viña del Mar. Si bien se ha postulado en algunos trabajos que la composición de la biopelícula de un sujeto podría variar dependiendo de la geografía en que se sitúa, estos trabajos mencionan diferencias entre países y continentes (Lloyd-Price *et al.*, 2016). Este es un factor a tener en cuenta a la hora de hacer comparaciones y para investigaciones futuras.

Al comparar los géneros bacterianos presentes en este estudio encontramos que son similares a los detectados por otros investigadores, los cuales no solo detectaron los mismos géneros descritos por nosotros, además se realiza una asociación tanto a biopelícula dental como a lesiones de caries (Soro *et al.*, 2013, Soro y Mira, 2015). En estos mismos trabajos se evidencia que la diferencia principal entre los géneros bacterianos de diente y de caries no se relaciona con la cantidad de bacterias encontradas si no que con su actividad metabólica, asimismo que los géneros sean más representados no implica que sean los metabólicamente más activos. La actividad metabólica bacteriana no fue examinada en este estudio, sin embargo, es un punto importante a tener en cuenta y se necesitan más estudios en este ámbito para poder contrastar de manera íntegra los resultados obtenidos.

En el caso del grupo probiótico encontramos que predominan los mismos géneros tanto en T1 como en T2, sin embargo, a estos géneros se les suman *Actinomyces* y *Campylobacter* en T2, pese a la detección de estos nuevos géneros, los índices de diversidad tendieron a disminuir en el grupo probiótico luego de terminada la intervención, esto se debe a que si bien encontramos más géneros en T2 comparado con T1, los índices de diversidad toman en cuenta la distribución de dichos géneros (Moreno, 2001). Por lo cual, al aumentar en el grupo probiótico la predominancia del género *Veillonella*, disminuye la diversidad.

Por otro lado, en el grupo control se conservaron casi todos los géneros, siendo solo un género no detectado y un nuevo género detectado en T2, pero manteniendo los géneros más abundantes relativamente constantes, esto se puede deber a que si bien el modelo *in situ* ha demostrado generar caries en esmalte superficial en un periodo de 14 días (Morón et al, 2012. Cury JA et al.,1997), el protocolo de modelo *in situ* está poco estudiado cuando se trata de obtención de biopelícula, pudiendo ser un periodo de tiempo discreto el de este trabajo para que se logre detectar diferencias significativas en cuanto a la distribución bacteriana de la biopelícula.

Una observación importante es que en ninguno de los grupos se detectó el género *Lactobacillus* como especie dominante, este hecho era de esperarse puesto que

se ha reportado en múltiples ocasiones que *Lactobacillus spp.* no se incorpora a la biopelícula oral en intervenciones ni a corto ni a largo plazo (Rodríguez *et al.*, 2016 Caglar *et al.*, 2009). En un estudio se evidenció que no hay detección del probiótico *L rhamnosus* después de un máximo de 7 días posterior al término de la administración del probiótico por vía oral (Yli-Knuutila *et al.*, 2006), lo cual se condice con este estudio ya que *L. ramnosus* no se detectó dentro de los géneros más frecuentes, más aún, no se detectó en ningún sujeto.

En un estudio del microbioma de la saliva mediante pirosecuenciación del ADNr 16S, luego de que los sujetos fueron expuestos a un probiótico, los *phyla* más abundantes detectados fueron: *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, y a nivel de género *Prevotella*, *Neisseria*, *Haemophilus* y *Streptococcus* (Dassi *et al.*, 2018). En comparación con este estudio en el grupo probiótico en T2 encontramos que *Firmicutes* fue el *phylum* más abundante seguido por *Proteobacteria* y en tercer lugar Bacteroidetes, en cuanto al género todos los mencionados excepto *Prevotella* fueron detectados dentro de los más abundantes, pese a que el estudio de Dassi fue en saliva podemos evidenciar similitudes entre sus resultados y los descritos en este estudio, sin embargo, hay que tener en cuenta que solo se limitaron a mostrar los 3 géneros y *phyla* más abundantes mientras que en este estudio la descripción es más amplia en cuanto a géneros y *phyla*, por lo cual, podrían enmascarse diferencias en los datos no explicitados.

Por otro lado, en una investigación que estudió el efecto del consumo de sacarosa en la biopelícula dental utilizando un modelo *in situ* de caries, al analizar los *phyla* más abundante en orden descendente fueron los siguientes: *Firmicutes*, *Poteobacteria* y *Bacteroidetes*, este orden se mantuvo tanto antes como después de la intervención con sacarosa. A nivel de género al igual que en el *phylum* el orden de abundancia se mantuvo tanto antes como después de haber sido expuestos a la sacarosa siendo este: *Streptococcus*, *Neisseria*, *Granulicatella*, *Veillonella*, *Gemella* y *Capnocytophaga* (Anderson *et al.*, 2018). Al comparar los *phyla* del estudio de Anderson con el grupo control de nuestro trabajo vemos que en este grupo también el orden de abundancia se mantuvo tanto en T1 como en T2 siendo este: *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*. A nivel de género

todos los géneros detectados por la investigación mencionada fueron detectados en el grupo control, siendo la única excepción *Capnocytophaga*, además al igual que en el estudio ya señalado el orden de abundancia tendió a mantenerse de T1 a T2, demostrando un comportamiento similar al descrito por los investigadores. Una diferencia importante en nuestro estudio fue que el género más abundante fue *Veillonella*, este se describe como un género que se encarga de regular el pH mediante diversos mecanismos, (Marsh *et al.*, 2017), además de estar asociada a salud periodontal (Hojo *et al.*2009), lo cual podría explicar que esté presente en gran cantidad en biopelícula sana.

Cuando se analizan las especies detectadas en este trabajo, hay que considerar que el estudio del microbioma oral es relativamente reciente, inicialmente los análisis se centraron en modelos de estudio descriptivos enfocados a géneros bacterianos, la principal dificultad a la que se enfrenta un investigador al momento de realizar una intervención, es el riesgo de generar un daño a los voluntarios y transgredir así los principios de la bioética, por lo cual, las investigaciones posteriores se han centrado en modelos *in situ* y en intervenciones beneficiosas que no presenten riesgo para los sujetos tales como evaluar la ingesta de probióticos, sin embargo, el principal enfoque de las investigaciones son los géneros bacterianos, siendo las únicas especies analizadas las del género *Streptococcus*, por lo cual, no existe o hay escasa evidencia para comparar nuestros resultados en relación a las especies con las de otros autores.

En múltiples estudios realizados por Simón Soro y Alex Mira, a nivel del género *Streptococcus*, describe las especies más representadas a *S. cristatus*, *S. sanguinis* y *S. mitis*, tanto en biopelícula de diente sano como en la biopelícula de caries de esmalte. Por otro lado, al comparar las biopelículas de diente sano y de caries de esmalte las especies que presentan un aumento considerable son *S. gordonii* y *S. mutans*. Por otro lado, Anderson y su equipo, en un estudio donde pirosecuenciaron el ADNr 16S de un biofilm expuesto a sacarosa (modelo *in situ*), detectaron a *S. mitis* y *S. infantis* como las especies más abundantes tanto antes como después de la introducción de sacarosa al dispositivo. En nuestro estudio encontramos *S. oralis* en primer lugar seguido por *S. cristatus* como los más

dominantes tanto en grupo control como probiótico, este hallazgo es consecuente con algunos estudios que sugieren que *S. oralis* es la especie más representada en la cavidad oral (Diaz *et al.*, 2012). Sumado a lo anterior, se sigue encontrando *S. sanguinis* en ambos grupos, pero en baja cantidad. En el grupo probiótico T2 se detectó *S. gordonii*, acompañado de un aumento de *S. sanguinis* y *S. mitis* un comportamiento similar a lo descrito por Soro. Por otro lado *S. mitis* disminuyó en el grupo control contrario a lo observado por los investigadores. Diversos estudios demuestran que *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, son un grupo heterogéneo capaz de adaptarse y volverse más acidogénicos o acidúricos dependiendo del ambiente en que se encuentren (Takahashi y Nyvad, 2008) esto nos orienta a pensar que al ser *S. oralis* la especie más abundante en todos los grupos puede ser la que toma un rol cariogénico cuando se produce un cambio ecológico negativo en el ambiente.

S. mutans no fue detectado en ningún grupo ni antes ni después de la intervención, esto no es de extrañarse ya que la población de este estudio fueron personas con COPD= 0 los cuales tienden a reportar una baja o nula presencia de dicha especie (Gamboa *et al.* 2016).

Los resultados de los índices de diversidad de la totalidad de géneros y especies variaron de manera similar. En cuanto a la diferencia entre grupos en T1, se observó diferencia significativa para los índices de Shannon y Simpson, no así en el N° de OTUS, según ello la diversidad de los grupos era distinta al inicio pese a que su carga bacteriana era similar, se ha reportado en múltiples ocasiones que la biopelícula tiene un gran índice de variación tanto a nivel de individuo como a nivel de sitio dentro del mismo individuo (Diaz *et al.*, 2012), por lo cual, no es extraño encontrar que entre grupo probiótico y control se presenten estas diferencias iniciales. Un factor para considerar es la diferencia geográfica entre los grupos probiótico y control, la cual podría explicar el por qué ambos grupos inicialmente presentan diferencias en composición y en índices de diversidad (Shannon y Simpson). Otra posible explicación puede ser que al ser una muestra pequeña de solo 10 sujetos por distribución aleatoria se hayan detectado diferencias que podrían desaparecer al aumentar la muestra.

Luego al comparar el grupo probiótico en T1 con T2 no se aprecian diferencias significativas, lo mismo ocurre con el grupo control. Lo que si se observó fue una tendencia a una disminución de la diversidad en probiótico y una tendencia a aumentar la diversidad en controles. Según Dassi *et al.*, al introducir un probiótico en el medio oral, la diversidad presenta una tendencia a aumentar sin ser estadísticamente significativa, lo cual es contrario a nuestro grupo caso, esto se puede deber a que su estudio se realizó en saliva y no en un modelo *in situ*. Por otro lado Anderson, en sus estudios, indica que en un modelo *in situ* de caries sin probióticos la diversidad disminuye de manera significativa lo cual es contradictorio con nuestros resultados pues la diversidad del grupo control en T2 presentó un leve aumento, esto se puede explicar mediante investigaciones más recientes que parecen sugerir que los probióticos no modifican la composición de la biopelícula, sino que modulan sus interacciones (McNulty *et al.*, 2011) otro hallazgo que da validez a esta hipótesis es que, en un estudio en saliva, posterior a la introducción de probiótico al realizar un “ordination analysis” se evidencio que no se formaron *clusters* por grupo, sugiriendo nuevamente que la estructura general del microbioma salival no es afectada por el consumo de corto plazo de probióticos (Dassi *et al.*, 2018).

Al contrastar los deltas de los grupos al final del estudio se evidenció que el comportamiento de crecimientos y de variaciones de diversidad en ambos grupos no presentó diferencias significativas apoyando una vez más la hipótesis de los probióticos como agentes reguladores de interacciones microbiológicas y no de composición (McNulty *et al.*, 2011).

Por otro lado, el aumento del N° de OTUS se produjo a un ritmo similar entre el grupo probiótico y el control, sugiriendo que el probiótico no presenta un efecto general sobre el crecimiento ni de los géneros ni de las especies cuando se analizan de manera general.

Ahora al analizar los índices de Shannon y Simpson en cada género por separado nos encontramos con que no es posible determinar una tendencia significativa en ningún grupo, si bien la diversidad debería aumentar, sin ser este aumento significativo, luego de exponer a la biopelícula a un probiótico según algunos

estudios (Dassi *et al.*, 2018), fue el grupo control el que presentó una tendencia a aumentar mientras que el grupo probiótico presentó comportamiento variado, esto podría explicarse si tomamos en cuenta los estudios en los que se postula que el probiótico no produce cambios en la abundancia ni diversidad de la biopelícula pero si regula sus interacciones (McNulty *et al.*, 2011).

Para una mejor comprensión, el microbioma oral en salud y enfermedad debiera ser descrito por una serie de funciones e interacciones y no por una lista de organismos presentes, pues estas funciones pueden ser cumplidas por diferentes microbios en diferentes personas (Lloyd-Price *et al.*, 2016) y un mismo microorganismo puede expresar diferentes funciones dependiendo de los estímulos ambientales a los que está expuesto (Takahashi y Nyvad, 2008).

Los resultados más significativos los encontramos al analizar el N° de OTUS de cada género por separado, es aquí en donde podemos apreciar si el género aumentó o disminuyó una vez terminada la intervención, es en este análisis en el que podemos observar comportamientos contrarios al comparar el grupo probiótico con el grupo control. En el grupo control la mayoría de los géneros aumentó su cantidad excepto *Leptotrichia spp* y *Capnocytophaga spp* en cambio el grupo probiótico se comportó de manera variada y en muchos casos opuesta al grupo control como se expone a continuación:

En el caso de *Streptococcus spp* en ambos grupos aumentó su número de OTUS de manera significativa, pero estadísticamente, este aumento presentó una mayor significancia en el grupo control, esto tiene sentido puesto que se ha asociado a las bacteriocinas de *Lactobacillus spp* como inhibidoras de otras especies cariogénicas entre ellas: *S. mutans*, *S. salivari*, *S. anginosus*, y *S. sanguinis* (Ahumada *et al.*, 2001). Además, se ha visto que en cultivos de *Lactobacillus spp* con *Streptococcus spp*, este último disminuye su capacidad de adhesión (Tahmourespour *et al.*, 2011).

Leptotrichia spp aumentó su número de OTUS en T2, el género *Leptotrichia* y los miembros de su especie fueron caracterizados recientemente (Eribe *et al.*, 2017) y en esta caracterización se ha encontrado evidencia de ser una especie altamente

sacarolítica al igual que *S. mutans*, incluso se ha propuesto como un posible biomarcador para caries, en este contexto es posible pensar que su aumento replica en menor medida el caso del género *Streptococcus*. Por otro lado, las interacciones entre este género y *Lactobacillus spp* no han sido tipificadas, por lo cual, son necesarios más estudios para llegar a entender realmente lo que ocurre a nivel microbiológico.

Capnocytophaga spp aumentó su número de OTUS, este género es dependiente de los niveles de CO₂ de la biopelícula, se ha descrito que mediante las redes metabólicas orales, *Lactobacillus spp* aumenta los niveles de CO₂ de la biopelícula favoreciendo de esta forma el crecimiento de *Capnocytophaga spp* (Hojo *et al.*, 2009).

Veillonella spp disminuyó su número de OTUS en el T2, se ha descrito una sinergia metabólica entre el género *Streptococcus* y el género *Veillonella* puesto que esta última se alimenta del ácido láctico producido por el primero (Hojo *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta que se presentó un aumento del género *Streptococcus* y una disminución del género *Veillonella* se puede sugerir que el probiótico presentó un efecto inhibitorio. Las interacciones entre el género *Lactobacillus* y *Veillonella* no están bien estudiadas, por lo cual, no se puede establecer un vínculo directo entre la introducción del probiótico y la disminución de *Veillonella spp* pero si se puede considerar que generalmente las bacteriocinas de *Lactobacillus spp* afectan a las bacterias Gram positivo, sin embargo, se ha descrito que las bacteriocinas de *L. rhamnosus* son capaces de afectar a bacterias Gram negativo como *Veillonella spp* (Sarika *et al.*, 2010).

Porphyromonas spp disminuyó su número de OTUS, por un lado, este resultado es inesperado ya que al igual que con el caso de *Veillonella spp*, el lactato producido por el género *Streptococcus* favorece el crecimiento de *Porphyromonas spp* (Marsh *et al.*, 2017), por lo cual, resulta paradójico encontrar un aumento del primero acompañado de una disminución del segundo. Una posible explicación a lo anterior es que *Lactobacillus spp* presenta actividad antimicrobiana contra *Porphyromonas gingivalis*, sobre todo la especie *L. rhamnosus* utilizada en este trabajo (Sookhee *et al.*, 2001 y Koll-klais *et al.*, 2005). Por otro lado, se ha visto

que la vitamina K sintetizada por *Veillonella spp* estimula el crecimiento de *Porphyromonas* (Hojo *et al.*, 2009), por lo cual su disminución afecta directamente a este género.

Haemophilus spp también disminuyó su número de OTUS, se ha reportado, en un estudio *in vitro*, que la especie *L. crispatus* posee una capacidad inhibitoria sobre el crecimiento de *H. influenzae* (Sogabe-Ashigaki *et al.*, 2015), no es extraño pensar que *L. rhamnosus* comparta el efecto inhibitorio sobre *H. influenzae*, tomando en cuenta que en este estudio dicha especie comprendió 65% del género en el grupo probiótico T1, esta interacción podría explicar la disminución de este género.

Neisseria spp disminuyó su número de OTUS, en el caso de este género no hay muchos estudios que describan sus interacciones con otras bacterias, por lo cual, no hay mucha información para comparar estos resultados. Lo que sí se puede considerar como una posible explicación son las bacteriocinas de *L. rhamnosus*, las cuales como se ha mencionado anteriormente son capaces de afectar bacterias Gram negativo como las del género *Neisseria*.

Si bien se han presentado posibles interacciones específicas de cada género para explicar su comportamiento, no hay que olvidar que las interacciones de la biopelícula oral son sumamente complejas, se ha mencionado en múltiples ocasiones que las bacteriocinas de *L. rhamnosus* son de amplio espectro y si bien, la mayoría de las bacterias Gram negativo seleccionadas para este análisis disminuyeron su número de OTUS (*Veillonella*, *Neisseria*, *Porphyromonas* y *Haemophilus*), encontramos los casos de los géneros *Leptotrichia* y *Capnocytophaga* que pese a ser Gram negativo incrementaron su número de OTUS. Por otro lado, *L. rhamnosus* presenta múltiples mecanismos antagonistas para *Streptococcus spp* y aun así este género prosperó. Es por estas razones que las interacciones a nivel de género y de especie deben ser más estudiadas de aquí en adelante para poder entender de una mejor manera las interacciones que hasta el momento no se han estudiado.

Finalmente, es necesario considerar las debilidades que presenta este estudio: la muestra es de tan solo 5 sujetos por grupo y no en todos los análisis se pudo usar pruebas estadísticas paramétricas, por lo cual la estadística del estudio no presenta el mismo nivel de significancia que tendría con una muestra más amplia, además los grupos se encontraban en ciudades distintas, lo cual puede ser un factor confundente al momento de comparar grupos. Por otro lado, sería relevante estudiar la actividad metabólica de las bacterias, lo cual según los estudios de Soro y Mira ha demostrado ser más importante que la cantidad de bacterias presentes en la biopelícula. Esperamos que pese a estas falencias, este trabajo pueda esclarecer, como un primer acercamiento, algunos de los efectos de los probióticos en la biopelícula y que pueda ser un punto de comparación una vez que se realicen más estudios en esta área.

7. Conclusiones

En conclusión, la diversidad y abundancia de la biopelícula en un modelo *in situ* intervenido con probiótico *L. rhamnosus* no se ve significativamente afectada luego de 14 días de tratamiento. De la misma manera, la diversidad y abundancia de la biopelícula de un modelo *in situ* tampoco presenta variaciones estadísticamente significativas al cabo de 14 días de tratamiento. Sin embargo, al comparar la biopelícula de un modelo *in situ*, con la biopelícula de un modelo *in situ* intervenido con el probiótico *L. rhamnosus*, se pueden apreciar diferencias en el desarrollo de algunos géneros específicos y estas diferencias podrían ser atribuidas a *L. rhamnosus*. Finalmente, son necesarios más estudios que complementen nuestros resultados para comprender de mejor manera la utilidad del empleo de probióticos para la prevención y el tratamiento de las enfermedades disbióticas orales como la caries dental.

8. Referencias bibliográficas

- Aires, C., Tabchoury, C., Del Bel Cury, A., Koo, H., & Cury, J. (2006). Effect of Sucrose Concentration on Dental Biofilm Formed in situ and on Enamel Demineralization. *Caries Research*, 40(1), 28-32.
- Anderson A, Rothballer M, Altenburger M, Woelber J, Karygianni L, Lagkouvardos I, Hellwig E & Al-Ahmad A. (2018). In-vivo shift of the microbiota in oral biofilm in response to frequent sucrose consumption. *Scientific Reports*, 8(1), 1-13.
- Ahumada, M, López M, Colloca M, & Nader-Macías M. (2001). Lactobacilli Isolation from Dental Plaque and Saliva of a Group of Patients with Caries and Characterization of their Surface Properties. *Anaerobe*, 7(2), 71-77.
- Badet C, Thebaud NB (2008). Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. *Open Microbiol J* 2(38-48).
- Bonifait L, Chandad F, Grenier D (2009). Probiotics for oral health: myth or reality? *J Can Dent Assoc* 75(8):585-590.
- Cagetti MG, Mastroberardino S, Milia E, Cocco F, Lingström P, Campus G (2013). The use of probiotic strains in caries prevention: a systematic review. *Nutrients* 5(7):2530-2550.
- Caglar E, Topcuoglu N, Cildir SK, Sandalli N, Kulekci G (2009). Oral colonization by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 after exposure to probiotics. *Int J Paediatr Dent* 19(5):377-381.
- Callahan B, Mcmurdie P, Rosen M, Han A, Johnson A, & Holmes S. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583.
- Cury, J., Rebello, M., & Del Bel Cury, A. (1997). In situ Relationship between Sucrose Exposure and the Composition of Dental Plaque. *Caries Research*, 31(4), 356-360.
- Dassi E, Ferretti P, Covello G, Bertorelli R, Denti A, De Sanctis V, Trett A, Segata N (2018). The short-term impact of probiotic consumption on the oral cavity microbiome. *Scientific Reports*, 8(1), 1-8.
- Diaz P.I, Dupuy A.K, Abusleme L, Reese B, Obergfell C, Choquette L, Dongari-Bagtzoglou A, Peterson D.E, Terzi E, and Strausbaugh L.D (2012). Using high throughput sequencing to explore the biodiversity in oral bacterial communities. *Mol Oral Microbiol*. 2012 June ; 27(3): 182–201. doi:10.1111/j.2041-1014.2012.00642.x.
- Edgar, R., Haas, B., Clemente, J., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 2011 Aug 15; 27(16): 2194 - 2200.
- Eribe, E., & Olsen, I. (2017). *Leptotrichia species in human infections II* (Vol. 9). Journal of oral microbiology. 2017; VOL. 9, 1368848; Taylor & Francis.
- Fejerskov O, Kidd EAM (2008). Dental caries : the disease and its clinical management. 2nd ed. Oxford: Blackwell Munksgaard.
- Gamboa, F., García, D., & Lamby, C. (2016). Biotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *S. mutans* en niños con y sin caries dental. *Revista Colombiana De Ciencias Químico Farmacéuticas*, 45(2), 288-304.
- Gruner D, Paris S, Schwendicke F (2016). Probiotics for managing caries and periodontitis: Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of dentistry*, 48, 16-25.

- Graves CE, Berkowitz RJ, Proskin HM, Chase I, Weinstein P, Billings R (2004). Clinical outcomes for early childhood caries: influence of aggressive dental surgery. *Journal of dentistry for children (Chicago, Ill)* 71(2):114-117.
- Hojo, K., Nagaoka, S., Ohshima, T., & Maeda, N. (2009). Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development. *Journal of Dental Research, November 2009, Vol.88(11), pp.982-990.*
- Jorgensen M, Castiblanco G, Twetman S, Keller M (2016). Prevention of caries with probiotic bacteria during early childhood. Promising but inconsistent findings. *Am J Dent* 2016;29:127-131.
- Kawashita Y, Kitamura M, Saito T (2011). Early childhood caries. *International journal of dentistry* 2011(725320).
- Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M and Glockner F (2012). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research, 2013, Vol. 41, No. 1*
- Koll-Klais P, Mandar R, Leibur E, Marcotte H, Hammarstrom L, Mikelsaar M (2005). Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20(6): 354-61.
- Longbottom C, Ekstrand K, Zero D, Kambara M (2009). Novel preventive treatment options. *Monographs in oral science* 21:156-163.
- Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., & Huttenhower, C. (2016). The healthy human microbiome. *Genome Medicine, 8(1), 51.*
- Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabe E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A *et al.* (2013). Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. *J Dent Res* 92(7):592-597.
- Marsh PD (2010). Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent Clin North Am* 54(3):441-454.
- Marsh PD, Zaura E (2017). biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol* 2017; 44 (Suppl. 18): S12–S22. doi: 10.1111/jcpe.12679.
- McNulty N, Yatsunenkov T, Hsiao A, Faith J, Muegge B, Goodman A, Henrissat B, Oozeer R, Cools-Portier S, Gobert G, Chervaux C, Knights D, Lozupone C, Knight R, Duncan A, Bain J, Muehlbauer M, Newgard C, Heath A, Gordon J (2011). The Impact of a Consortium of Fermented Milk Strains on the Gut Microbiome of Gnotobiotic Mice and Monozygotic Twins. *Sci Transl Med* 3, 106ra106 (2011)
- Moreno, C. E. 2001. *Métodos para medir la biodiversidad*. M&T–Manuales y Tesis SEA, vol. 1. Zaragoza, España, 84 pp.
- Moron, B., Comar, L., Wiegand, A., Buchalla, W., Yu, H., Buzalaf, M., & Magalhães, A. (2013). Different Protocols to Produce Artificial Dentine Carious Lesions in vitro and in situ: Hardness and Mineral Content Correlation. *Caries Research, 47(2), 162-170.*
- Näse, L., K. Hatakka, E. Savilahti, M. Saxelin, A. Pönkä, T. Poussa, R. Korpela, and J.H Meurman. "Effect of Long–Term Consumption of a Probiotic Bacterium, Lactobacillus Rhamnosus GG, in Milk on Dental Caries and Caries Risk in Children." *Caries Research* 35.6 (2001): 412-20. Web.
- Nigel B. Pitts, Domenick T. Zero, Phil D. Marsh, Kim Ekstrand, Jane A. Weintraub, Francisco Ramos-Gomez, Junji Tagami, Svante Twetman, Georgios Tsakos and Amid Ismail (2017). Dental caries. *Nature reviews, disease primers, Article number: 17030*

- Petersen PE (2003). The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community dentistry and oral epidemiology* 31 Suppl 1(3-23).
- Petti S, Tarsitani G, D'Arca AS (2001). A randomized clinical trial of the effect of yoghurt on the human salivary microflora. *Arch Oral Biol* 46(8):705-712.
- Pahumunto, N., Piwat, S., Chankanka, O., Akkarachaneeyakorn, N., Rangsitsathian, K., & Teanpaisan, R. (2018). Reducing mutans streptococci and caries development by *Lactobacillus paracasei* SD1 in preschool children: A randomized placebo-controlled trial. *Acta Odontologica Scandinavica*, 76(5), 331-337.
- Rodríguez, G, Ruíz, B, Faleiros Chioca, Simone, Vistoso, A, Marró, M, Sanchez, J, Urzua, I, Cabello, R. (2016). Probiotic Compared with Standard Milk for High-caries Children: A Cluster Randomized Trial. *Journal of Dental Research* 2016, Vol. 95(4) 402– 407.
- Sarika A.R, Lipton A.P and Aishwarya M.S. (2010). Bacteriocin Production by a New Isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under Different Culture Conditions. *Advance Journal of Food Science and Technology* 2(5): 291-297, 2010.
- Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB (2007). Dental caries. *Lancet* 369(9555):51-59.
- Seminario - Amez, Maria, López López, José, Estrugo - Devesa, Albert, Ayuso Montero, Raúl, & Jané Salas, Enric. (2017). Probiotics and oral health: A systematic review. *Medicina Oral*, E282-E288.
- Simon-Soro A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Alcaraz LD, Mira A (2013a). A tissue-dependent hypothesis of dental caries. *Caries Res* 47(6):591-600.
- Simón-Soro, A., & Mira, A. (2015). Solving the etiology of dental caries. *Trends in Microbiology*, 23(2), 76-82.
- Sogabe-Ashigaki K, Imai S, Okada A, Matin K, Akimaru G, Terai T, Okomura T, Hanada N, Kawahara H. (2015). Effects of *Lactobacillus crispatus* as a candidate for oral probiotic bacteria on *Haemophilus influenzae*. *Asian Pac J Dent* 2015; 15:3-11
- Sookhee S, Chulasiri M, Prachyabrued W (2001). Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. *J Appl Microbiol* 2001; 90(2): 172-179.
- Schmieder R y Robert Edwards R (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, Volume 27, Issue 6, 15 March 2011, Pages 863–864.
- Takahashi N, Nyvad B (2008). Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res* 42(6):409-418.
- Teughels W, Van Essche M, Sliepen I, Quirynen M (2008). Probiotics and oral healthcare. *Periodontol* 2000 48(111-147).
- Tahmourespour A, & Kermanshahi R. (2011). The effect of a probiotic strain (*Lactobacillus acidophilus*) on the plaque formation of oral Streptococci. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 11(1), 37-40.
- Twetman S, Keller MK (2012). Probiotics for caries prevention and control. *Adv Dent Res* 24(2):98-102.
- Twetman S (2018). Prevention of dental caries as a noncommunicable disease. *Eur J Oral Sci* 2018; 126(Suppl. 1): 19–25.

WHO/FAO (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food.

Yli-Knuuttila H, Snäll J, Kari K, Meurman JH (2006). Colonization of *Lactobacillus rhamnosus* GG in the oral cavity. *Oral Microbiol Immunol* 21(2):129-131.

Young-Hye Sung, Hae-Young Kim, Ho-Hyun Son, & Juhea Chang. (2014). How to design in situ studies: An evaluation of experimental protocols. *Restorative Dentistry & Endodontics*, 39(3), 164-171.

Wang, Qiong, Garrity, George M., Tiedje, James M., & Cole, James R. (2007). Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261-5267.

9. Anexos

Anexo 1: Consentimientos informados



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

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

Investigador Principal: Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez

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

Nombre del Donante

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

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

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

Justificación de la Investigación

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

Objetivo

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

Beneficios

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

Tipo de Intervención y Procedimiento

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

Riesgos

Los dientes donados se utilizarán sólo con el fin expuesto y no se guardará ningún registro de su relación con usted como donante. Ningún otro tipo de estudio se realizará con los dientes. Una vez observados y descritos, los dientes serán destruidos y eliminados siguiendo los protocolos de bioseguridad. La donación en sí no presenta riesgos, ni costos adicionales para usted, y el financiamiento del proceso quirúrgico de extracción será su responsabilidad.

Criterios para selección de los participantes en el estudio

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

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 Livingstone 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 Ética 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 del establecimiento donde realiza la investigación o de su representante:	Firma	Fecha
---	-------	-------

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:

a) 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

b) 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.

c) 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 Pohlhammer 943, Independencia, de lunes a viernes en el horario comprendido entre las 8:00 y 17:00 hrs. En el periodo 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 Ética 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 cec.fouch@odontologia.uchile.cl



Doy mi consentimiento al investigador y al resto de colaboradores, a realizar el procedimiento diagnóstico pertinente, PUESTO QUE SE 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: _____

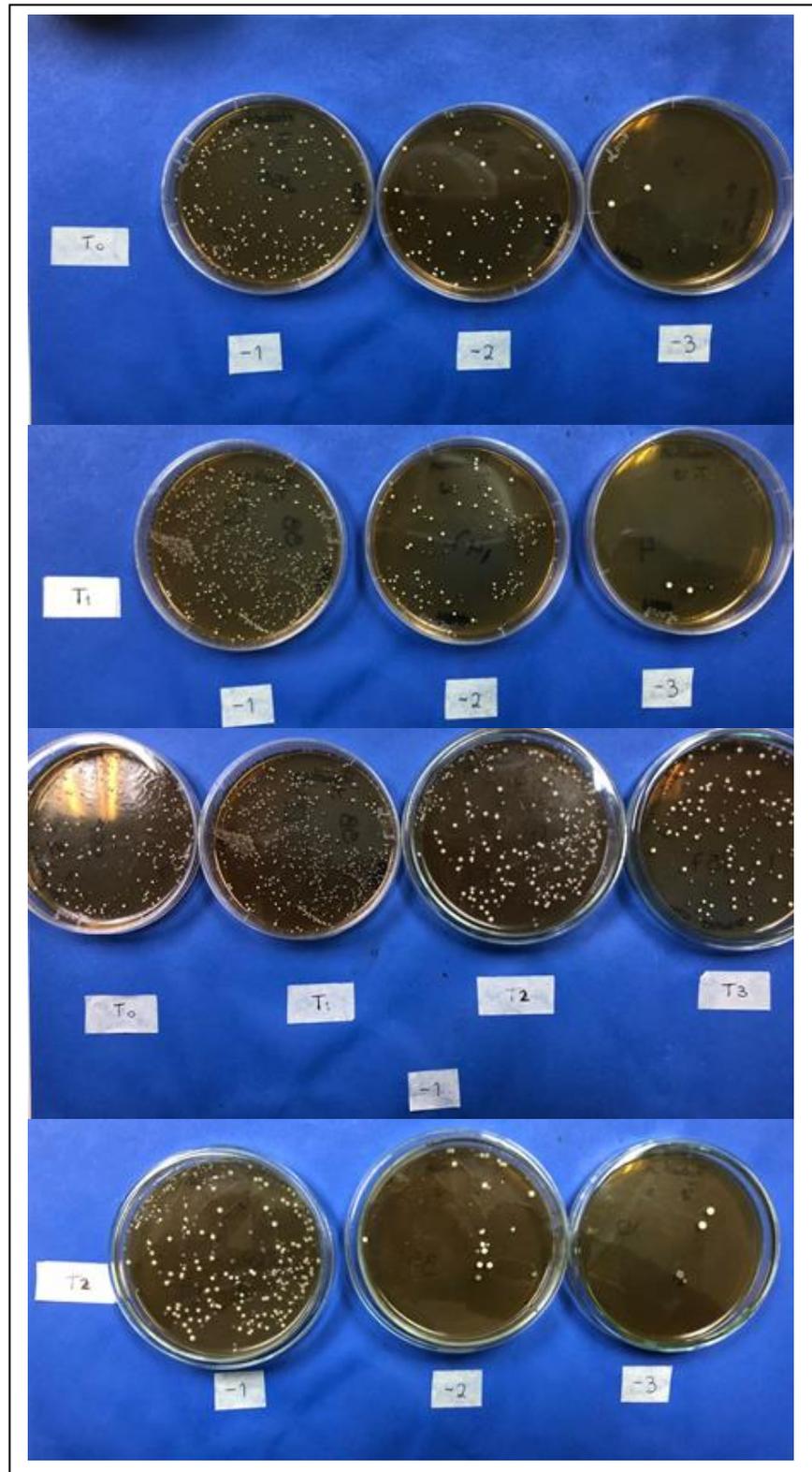


Nombre del Director del establecimiento donde realiza la investigación o de su representante _____

Firma: _____

Fecha: _____

Anexo 2: Fotos de disolución y siembra *L. rhamnosus*



Anexo 3: Protocolo de manejo del dispositivo

<p>Concurso de proyectos de investigación en odontología</p>	<p><i>“La educación científica de los jóvenes es al menos tan importante, quizá incluso más, que la propia investigación”.</i> Glenn Theodore Seaborg</p>	 <p>Protocolo para manipulación de dispositivos intraorales durante la intervención</p>
		
<p>Fondo para la investigación en odontología (fiouch)</p> <p>Facultad de odontología Dirección de investigación Universidad de Chile</p>	<p>Sergio Livingstone P # 943, INDEPENDENCIA. Teléfono: 2978 1845 e-mail: investigacion@odontologia.uchile.cl SANTIAGO – CHILE</p>	<p>Sergio Livingstone P # 943, INDEPENDENCIA. Teléfono: 2978 1845 e-mail: investigacion@odontologia.uchile.cl SANTIAGO – CHILE</p>
		
<p>Indicaciones generales</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sacar dispositivo al cepillarse y alimentarse. • Higiene oral 2 veces al día, dos minutos, 2 arvejas; pasta fluorada. • No fumar. • No utilizar colutorios. • No consumir bebidas alcohólicas. • Sacar máximo 4 veces al día 30 min 	<p>Manejo extraoral dispositivo</p> <ul style="list-style-type: none"> • Al remover el dispositivo almacenarlo en jabonera envuelto en 1 cuadrado de toalla nova de 20x20 cm humedecida en 10 mL de agua. 	<p>Indicaciones farmacológicas</p> <ul style="list-style-type: none"> • No utilizar ningún tipo de terapia antibiótica en el transcurso de la intervención. • En caso de consumir algún tipo de fármaco (prohibido ATB) durante la intervención ponerse en contacto con algún encargado.

Anexo 4: Pauta de aplicación de sacarosa y probiótico

Día	Gotas de Sacarosa (aplicar cada 2 horas)								
	1	2		3	4	5	6	7	8
		Probiótico	Sacarosa						
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									

Anexo 5: Auto evaluación de cumplimiento

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	Omití más de 5 aplicaciones durante el periodo experimental	
3	Omití 2 a 5 aplicaciones durante el periodo experimental	
4	Omití 1 aplicación durante todo el período 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		
Omití 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.

10. Glosario

Abundancia: número de individuos que presenta una comunidad por unidad de superficie o de volumen (densidad de la población).

Diversidad/ Biodiversidad: variabilidad entre los organismos vivientes de todas las fuentes, así como los complejos ecológicos de los que forman parte; esto incluye diversidad dentro de las especies (α - diversidad), entre especies (β -diversidad) y de ecosistemas (γ - diversidad). El término comprende, por tanto, diferentes escalas biológicas: desde la variabilidad en el contenido genético de los individuos y las poblaciones, el conjunto de especies que integran grupos funcionales y comunidades completas, hasta el conjunto de comunidades de un paisaje o región.

Diversidad- α : diversidad intrínseca de una comunidad particular a la que consideramos homogénea

Índice de Simpson: Manifiesta la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de una muestra sean de la misma especie. Está fuertemente influido por la importancia de las especies más dominantes. Como su valor es inverso a la equidad, la diversidad puede calcularse como $1 - \lambda$.

$$\lambda = 1 - \sum_{i=1}^S p_i^2$$

P_i : número de individuos de la especie i respecto al total de individuos de las S especies de una comunidad.

Índice de Shannon: Expresa la uniformidad de los valores de importancia a través de todas las especies de la muestra. Mide el grado promedio de incertidumbre en predecir a que especie pertenecerá un individuo escogido al azar de una colección. Asume que los individuos son seleccionados al azar y que todas las especies están representadas en la muestra. Adquiere valores entre cero, cuando hay una sola especie, y el logaritmo del número total de especies (S), cuando

todas las especies están representadas por el mismo número de individuos. Se calcula usando la siguiente fórmula:

$$\bar{H} = -\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

P_i : número de individuos de la especie i respecto al total de individuos de las S especies de una comunidad.

Modelo *in situ*: modelo de estudio que se realiza en el mismo lugar donde se encuentra u ocurre el objeto de análisis

Unidad taxonómica operacional (OTU): es una unidad de clasificación seleccionada por el investigador que la utiliza para individualizar a objetos de su estudio, ya sea una especie u otro taxón de cualquier categoría tales como: una morfoespecie, una población, y hasta un individuo. Esto permite ordenarlos en una clasificación y en la construcción de un árbol filogenético, sin juzgar si se corresponden a una entidad biológica particular. Suele ser aplicado cuando están disponibles datos de secuencias de ADN.