



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE RESTAURADORA
ÁREA DE CARIOLOGIA

Efecto del consumo de probiótico *lactobacillus rhamnosus* en la densidad mineral, dureza superficial y morfología superficial de esmalte en un modelo *in situ* de caries

Nicolás José Azán Peralta

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Rodrigo Antonio Cabello Ibacache

TUTOR ASOCIADO

Dra. Patricia Liliana Palma Fluxá

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



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE RESTAURADORA
ÁREA DE CARIOLOGIA

Efecto del consumo de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en la densidad mineral, dureza superficial y morfología superficial de esmalte en un modelo *in situ* de caries

Nicolás José Azán Peralta

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

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Rodrigo Antonio Cabello Ibacache

TUTOR ASOCIADO

Dra. Patricia Liliana Palma Fluxá

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

DEDICATORIA

*A mi hermosa y amada madre,
Claudia Alondra Peralta Russel, que con su infinito amor, inmenso apoyo y eterna
complicidad todo esto fue posible.*

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores tutores que me ayudaron en esta última etapa de mi formación de Pregrado, Dr Rodrigo Cabello y Dra Patricia Palma quién además durante los 6 años de mi formación académica, me mostró el camino de la investigación y extensión universitaria. También al Director Escuela de Pregrado, Dr. Gonzalo Rodríguez por su paciencia y dedicación en mi investigación.

A las personas pertenecientes al Laboratorio de Microbiología, Darna Venegas, Daniela Salinas y Carmen Gálvez por recibirme, acogerme y enseñarme durante estos últimos 4 años.

A mis amigos, polola y a todas las personas que caminaron junto a mi durante mi formación universitaria iniciada en el Programa de Bachillerato.

Al microtomógrafo computarizado, Fondecip EQM130028 de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

A mi madre Claudia Alondra Peralta Russel, quien con su amor me ha dado todo lo que necesito para ser feliz.

ÍNDICE

I.	RESUMEN	
II.	MARCO TEORICO	10
2.1	Introducción	10
2.2	Caries	11
2.3	Biopelícula	12
2.4	Esmalte	13
2.5	Proceso de desmineralización y mineralización	14
2.6	Probióticos	16
2.7	Modelo <i>in situ</i> de caries	18
2.8	Planteamiento del problema	19
III.	HIPÓTESIS	20
IV.	OBJETIVO GENERAL	20
V.	OBJETIVOS ESPECIFICOS	20
VI.	MATERIAL Y MÉTODOS	21
6.1	Diseño Experimental	21
6.2	Construcción de la muestra	22
6.3	Obtención y almacenamiento de dientes	22
6.4	Preparación de los bloques de esmalte	22
6.5	Obtención y diseño del dispositivo intraoral	23
6.6	Fase clínica de los grupos experimentales	24
6.7	Microdureza superficial de Vickers (MSV)	25
6.8	Microtomografía computarizada (Micro-CT) y densidad mineral	26
6.9	Microscopia electrónica de barrido (SEM)	27
6.10	Análisis estadístico	27

6.11	Recolección de dispositivos	28
6.12	Pruebas de viabilidad y carga de <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	28
VII.	RESULTADOS	31
7.1	Caracterización demográfica, periodontal y COPD	31
7.2	Medición de microdureza de Vickers	31
7.3	Imágenes obtenidas a partir de Micro-CT y densidad mineral	33
7.4	Resultados de mediciones de densidad mineral	34
7.5	Microscopia electrónica de barrido (SEM): Morfología Superficial	35
VIII.	DISCUSIÓN	38
IX.	CONCLUSIONES	43
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	44
XI.	ANEXO 1: Acta de aprobación de proyecto de investigación	56
XII.	ANEXO 2: Consentimiento informado	59
XIII.	ANEXO 3: Donación terceros molares	63
XIV.	ANEXO 4: Protocolo de intervención probiótico Sistémico	65
XV.	ANEXO 5: Evaluación de cumplimiento	68
XVI.	ANEXO 6: Evaluación de cumplimiento final	69
XVII.	ANEXO 7: Ficha clínica	70

I. RESUMEN

Introducción: La caries dental sigue siendo un problema de salud altamente prevalente en la población mundial generando una disminución en la calidad de vida, por lo cual, estrategias preventivas toman gran relevancia para evitar las consecuencias derivadas de esta enfermedad. Los probióticos según la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS) son microorganismos vivos que cuando se administran en dosis adecuadas confieren un beneficio para la salud del hospedero. En cavidad oral los probióticos han demostrado controlar la disbiosis microbiológica mediante diversos mecanismos, entre ellos se mencionan, la coagregación, la inhibición competitiva y la producción de ácidos orgánicos, disminuyendo de esta manera el fenómeno de desmineralización.

Objetivo: Establecer las diferencias en la dureza superficial, densidad mineral y morfología superficial de bloques de esmalte de un modelo *in situ* de caries luego de la exposición de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formato sistémico.

Metodología: Mediante un modelo *in situ* de caries, 14 voluntarios utilizaron un dispositivo intraoral que contenía 5 bloques de esmalte por 14 días durante día y noche. Los voluntarios fueron asignados aleatoriamente a dos grupos experimentales: grupo expuesto al probiótico *Lactobacillus rhamnosus*/sacarosa y el grupo experimental expuesto solamente a sacarosa. Ambos grupos debieron cumplir el desafío cariogénico de instilar cada 2 horas 8 veces al día sacarosa sobre los bloques de esmalte. A su vez, el grupo probiótico/sacarosa debía consumir una vez al día 150 mL de agua en la que se suspendió una dosis liofilizada de *Lactobacillus rhamnosus*. En las muestras de esmalte se evaluó microdureza superficial, densidad mineral y morfología superficial.

Resultados: La microdureza y densidad mineral presentaron una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($P < 0.05$). Por otra parte, la morfología superficial de las muestras pertenecientes al grupo sacarosa se

visualizaron más porosas e irregulares que las muestras del grupo probiótico/sacarosa.

Conclusiones: La exposición al probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formato sistémico disminuyó el fenómeno de desmineralización en bloques de esmalte de un modelo *in situ* verificado mediante la dureza superficial, densidad mineral y morfología superficial de estos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Introducción

En los últimos años la salud oral no ha mejorado y con ello las condiciones orales continúan siendo un importante eje para la salud pública mundial. A consecuencia de los cambios demográficos ocurridos en las últimas dos décadas, que incluyen el crecimiento poblacional, la mayor expectativa de vida y el envejecimiento generalizado, es que la carga acumulada de todas las condiciones de salud oral aumentaron drásticamente entre 1990 y el 2015 (Kassebaum, Smith, Bernabé et al; 2017). Prácticamente la mitad de la población mundial sufre de problemas derivados por alguna enfermedad de la cavidad oral. Dentro de ellas, la caries dental no tratada en dientes permanentes fue la condición más prevalente afectando a 2.5 billones de personas en todo el mundo, lo que equivale al 35% de la prevalencia global para todas las edades combinadas (Kassebaum, Smith , Bernabé et al; 2017). Por otra parte, en el año 2010, Marcenes reportó sobre caries no tratadas en dentición temporal como la décima condición más prevalente en un estudio de la carga mundial de enfermedades. En Chile, la caries dental comienza desde los primeros años de vida y presenta un incremento considerable con el paso de los años. Según estudios nacionales a los 2 años la prevalencia de caries es de un 17,5%, de 49,6% a los 4 años y de 70,4% a los 6 años. A los 12 años es de 62,5%, aumentando hasta llegar a un 99,4% en adultos de 65 a 74 años. (MINSAL 2017). Las lesiones de caries no tratadas conllevan a estados avanzados de daño, los que se manifiestan con dolor, pérdida de funcionalidad y problemas estéticos, afectando negativamente la calidad de vida de las personas (Kamran et al., 2017).

Considerando que la caries es un problema de salud pública debido a su alta prevalencia y a las consecuencias que genera en la cavidad oral surge la necesidad de prevenir con mayor eficacia la ocurrencia de esta enfermedad, y el uso de probióticos podría ser una opción terapéutica que complementa los tratamientos preventivos clásicos como lo son las terapias remineralizantes, el uso

de sellantes para fosas y fisuras, entre otros (Kawashita et al., 2011; Longbottom et al., 2009).

2.2 Caries

La caries dental es una enfermedad disbiótica altamente prevalente en todo el mundo, la progresión de esta patología es lenta y su etiología de índole multifactorial (Fejerskov and Kidd, 2008). Se considera un proceso dinámico donde ocurre una disolución química del esmalte provocada por la actividad metabólica de la biopelícula oral que cubre la superficie de los dientes. (Fejerskov and Kidd, 2013). La patogenia de la caries es mediada por bacterias endógenas acidogénicas que producen ácidos orgánicos débiles como subproducto del metabolismo de carbohidratos fermentables. Este ácido causa valores de pH local por debajo del valor crítico de 5,5 lo que resulta en la desmineralización de los tejidos dentales (Selwitz et al., 2007). El signo resultante de los descensos repetitivos de pH provocados por las bacterias de la biopelícula oral ubicada sobre la superficie de los dientes es la formación de una lesión clínicamente detectable (Fejerskov and Kidd, 2011).

Recientemente análisis metagenómicos de comunidades bacterianas han postulado que la caries dental podría ser una enfermedad tejido-dependiente influenciada por azúcares fermentables disponibles y el pH de la placa (Simonsoro et al., 2013). Los sustratos azucarados juegan un rol importante en la disbiosis de la microbiota oral, en donde participan múltiples especies cariogénicas como *S. mutans*, *S. mitis* y *Lactobacillus* spp, entre otros. Esta microbiota cariogénica que por mecanismos de selección ecológica es menos diversa que la microbiota oral de individuos sanos está constituida por bacterias acidogénicas y acidofílicas que generan un ambiente ácido en presencia de azúcares fermentables, los que, además son el sustrato de las glucosiltransferasas que sintetizan polímeros extracelulares que facilitan fenómenos de adhesión y co-agregación bacteriana (Zhan, 2018). Como ejemplo de lo anterior, en condiciones de alta y prolongada exposición a ácidos, los microorganismos acidúricos presentes en la cavidad oral se hacen más dominantes y desarrollan fenotipos aún más

acidogénicos, involucrando no sólo a *S.mutans* y *Lactobacillus* spp., sino también a especies acidúricas de *Streptococcus* del tipo no-mutans, *Actinomyces*, *Bifidobacterium* y levaduras. Así, muchas bacterias acidogénicas y acidúricas están involucradas en el proceso de caries, apoyando la noción de que esta etiología es altamente compleja (Takahashi and Nyvad, 2008; 2011).

Los factores de riesgo que comúnmente se asocian a la caries dental son bastante diversos entre los que se pueden mencionar factores de tipo físicos, biológicos, medio ambientales, de comportamiento y relacionados con los estilos de vida, como ejemplo de lo anterior cabe mencionar, un inadecuado flujo y/o composición salival, una alta carga bacteriana cariogénica, una exposición insuficiente a fluoruros, componentes inmunológicos, factores genéticos, una dieta rica en carbohidratos fermentables y una inadecuada higiene oral (Selwitz et al., 2007).

2.3 Biopelícula

La biopelícula es una comunidad de microorganismos inmersos en una matriz compleja de sustancias poliméricas extracelulares. Las bacterias en una biopelícula pueden volverse más resistentes a la mayoría de los agentes antimicrobianos y a las defensas del hospedero en comparación con sus formas planctónicas. El desarrollo de biopelículas es un proceso dinámico y progresivo (Longhui et al, 2017). Dentro de la biopelícula oral se dan relaciones simbióticas entre microorganismos creando una estructura espacial particular, generando de esta forma, gradientes locales de nutrientes y oxígeno volviéndose más resistente al modular un entorno físico-químico favorable para ella (Mark et al, 2016).

A los pocos segundos de que la superficie dental está en contacto con el medio oral, restos de células epiteliales orales, productos de microorganismos, proteínas y glicoproteínas biológicamente activas derivadas principalmente de la saliva y del fluido crevicular gingival se depositan en la superficie de los dientes formando lo que se conoce como película adquirida (PA) (Marsh, 2010). Las proteínas salivales tales como la histatina, estaterina y la cistatina poseen una alta afinidad

por el calcio y fosfato, estas proteínas comúnmente llamadas precursores de la película, inician el proceso de formación de la PA a través de interacciones electroestáticas con la superficie del esmalte (Lee and Zimmerman, 2013). Luego, la adhesión de colonizadores primarios, que son microorganismos que están en suspensión en la cavidad oral, a los receptores de las proteínas de la película adquirida genera un acoplamiento irreversible siendo esta unión fundamental para la co-agregación bacteriana venidera. Las primeras especies comienzan a multiplicarse, su metabolismo genera un cambio en el medio ambiente local tornándolo más anaeróbico. (Marsh, 2010). Con el paso de los minutos los colonizadores primarios se vuelven más exigentes, en donde, la expresión en su superficie celular de adhesinas para la interacción célula-célula con receptores de colonizadores secundarios como anaeróbicos estrictos, determina finalmente la co-agregación bacteriana generando una biopelícula diversa. Esta biopelícula es espacial y funcionalmente organizada, presentando condiciones altamente heterogéneas desde una perspectiva molecular entre dos puntos separados por distancias nanométricas, provocando cambios fenotípicos y genotípicos en los consorcios bacterianos. De esta forma se desarrolla una cooperación metabólica entre especies las cuales pueden alterar sustancialmente su fisiología para maximizar los recursos disponibles, además, de transferir genes que codifican para la resistencia de antibióticos (Mark et al 2016; Marsh 2010).

2.4 Esmalte

El esmalte dental es el tejido más duro del cuerpo humano, inicialmente, durante la amelogenesis, comienza como un tejido rico en proteínas, las cuales en el momento que el diente erupciona sólo una fracción muy pequeña permanece en la estructura (Duverger, 2016).

El esmalte dental está compuesto predominantemente por cristales de hidroxiapatita los que poseen un alto porcentaje de calcio y fosfato. El 96% del esmalte corresponde a una matriz inorgánica, y tan sólo el 4% a agua y matriz orgánica, constituida esta última, principalmente por proteínas y lípidos que se

disponen entre los cristales de hidroxiapatita (HA) (Duverger, Beniash, 2016). Exactamente, la matriz orgánica del esmalte representa menos del 1% en peso, pero juega un rol fundamental en propiedades como la tenacidad y la resistencia a ataques químicos. (Teruel, Alcolea, 2015)

La unidad estructural básica del esmalte son los prismas del esmalte constituidos por hidroxiapatita de forma hexagonal. Los prismas de esmalte son cristales alargados que se disponen en matrices paralelas con sus ejes cristalográficos perfectamente alineados, estos, tienen un diámetro aproximadamente de 2-3 micras y están envueltos por una capa muy delgada de material orgánico de naturaleza proteica (Baldassarri, Margolis, et al; 2008). Si bien es cierto que esta capa orgánica está en toda la periferia de los prismas, su concentración es mayor a medida que se acerca al límite amelodentinario (Olivier Duverger, Elia Beniash, 2016).

2.5 Proceso de desmineralización y mineralización

La biomineralización es un proceso complejo, dinámico y que ocurre a lo largo de toda la vida, por medio de este fenómeno los organismos vivos controlan la precipitación de nano-cristales inorgánicos dentro de matrices orgánicas para formar tejidos biológicos híbridos compuestos de una fase inorgánica y orgánica como, por ejemplo, el esmalte dental. Los dientes que están expuestos constantemente a ataques ácidos han desarrollado una alta resistencia localizada a la desmineralización no igualada por ningún otro tejido vivo (Neel and Aljabo; 2016).

En el proceso de desmineralización ocurre una pérdida de iones minerales a partir de los cristales de HA debido a un cambio en el entorno químico del diente, estos iones perdidos por la HA no necesariamente generan una pérdida de continuidad y/o integridad de la superficie del diente, pero sí podrían llegar a generar un aumento en la sensibilidad ante estímulos térmicos y físicos. La desmineralización es un proceso totalmente reversible, por lo tanto, los cristales de HA que están

parcialmente desmineralizados pueden remineralizarse si están expuestos a un ambiente oral favorable (Maheswari, 2015).

La producción de ácidos orgánicos débiles como subproducto del metabolismo de bacterias acidogénicas, entre las que se puede mencionar, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus* spp causa un descenso en el nivel de pH local generando en la interfase diente-biopelícula una instauración con respecto a los cristales de HA favoreciendo de esta forma una difusión continua de calcio, fosfato y carbonato, pudiendo generar una lesión de caries visible. La lesión de caries que es uno de los signos clínicos de la enfermedad posee una progresión que se representa frecuentemente con la pérdida inicial de los minerales a niveles nanométricos generando una etapa sub-clínica hasta la destrucción completa del diente (Selwitz et al., 2007). Sin embargo, el desarrollo real de la lesión de caries es un proceso altamente dinámico en donde existen períodos alternos de desmineralización/remineralización. Más complejo aún, en ciertos casos estos fenómenos ocurren de forma simultánea en la cual, en la superficie del esmalte se forma fluorhidroxiapatita mientras que en la subsuperficie ocurre el fenómeno de desmineralización de la hidroxiapatita, todo esto, como consecuencia de las distintas solubilidades y saturaciones de la fluorhidroxiapatita y la hidroxiapatita a pH 5,5 (Fejerskov y Kidd, 2008; Selwitz et al., 2007). El proceso de remineralización ocurre cuando el pH del medio oral se encuentra por sobre 5,5 el que es denominado pH crítico, en donde la saliva actúa como medio de amortiguación sobresaturando el medio oral con calcio, fosfato y fluoruros respecto al esmalte (Dowd, 1999). El fluoruro, por su parte, actúa como un potente catalizador para la difusión de calcio y fosfato hacia el interior del diente remineralizando los cristales y formando hidroxiapatita fluorada la cual es mucho más resistente al ataque ácido que la estructura original (Selwitz et al., 2007).

Este proceso ocurre varias veces al día en todas las personas, en donde frecuentemente se alcanza un equilibrio dinámico para mantener de esta forma el

status quo entre la ganancia y pérdida de minerales evitando un desbalance que origina lesiones de caries (Selwitz et al., 2007).

2.6 Probióticos

Los probióticos se definen como microorganismos vivos, principalmente bacterias, que son seguras para el consumo humano, y que cuando se ingieren en cantidades adecuadas traen consigo efectos beneficiosos para la salud del individuo más allá de los nutricionales. Esta definición ha sido aprobada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Bonifait et al., 2009).

Las bacterias probióticas han sido utilizadas en el tratamiento y prevención de una amplia gama de condiciones, patologías y síndromes en el ser humano (Longbottom et al., 2009). Inicialmente los probióticos se estudiaron por sus acciones a lo largo del sistema digestivo previniendo la adhesión e invasión de bacterias patógenas modificando el entorno intestinal y modulando la respuesta inmune inflamatoria local y sistémica. Las principales especies aisladas y desarrolladas para aplicaciones gastrointestinales fueron también adoptadas y estudiadas para verificar su efecto a nivel de la cavidad oral, específicamente para la prevención de la caries dental, promoviendo un aumento en el pH oral, disminución en el recuento de bacterias patógenas acidogénicas y compitiendo por nichos ecológicos. Entre las especies destacamos a algunas del género *Lactobacillus* como *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LB21, *L. reuteri*, *L. paracasei*, *L. brevis* CD2 y de otros géneros como *Bifidobacterium* spp. (Cagetti et al., 2013).

Las bacterias probióticas para poder tener un efecto benéfico en la salud oral de la población y lograr una limitación o prevención de la caries dental se deben poder adherir a las superficies dentales e integrarse en las comunidades bacterianas que componen la biopelícula. También deben competir y antagonizar con las bacterias cariogénicas evitando de esta forma su proliferación, para implementar una cepa

efectora, no patógena, en la microbiota del hospedero y mantener o restaurar el microbioma natural al interferir o inhibir a otros microorganismos, especialmente aquellos patógenos.

En el 2001, Ahumada et al., demostraron que el 36% de Lactobacilos aislados desde la lengua inhibieron el crecimiento de *S. mutans*. En otro estudio, los mismos autores reportan que Lactobacilos aislados de pacientes con caries activas producen ciertas sustancias inhibitorias especificas afectando especialmente a especies de *Streptococcus*. Koll-Klais et al., demostraron que el 69% de los Lactobacilos analizados inhibieron a *S. mutans*, un 88% inhibieron a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y el 82% a *Porphyromonas gingivalis*. Concluyendo que la mayor actividad antimicrobiana se asoció a *Lactobacillus rhamnosus*.

Un estudio más reciente, mediante un ensayo clínico comunitario controlado aleatorizado por clusters evidenció que en una población de preescolares luego de 10 meses de consumo regular de leche con un probiótico a base de Lactobacilos, 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 ($p < 0,05$) (Rodríguez et al., 2016).

Varios mecanismos de acción para los probióticos se mencionan en la literatura, pero ninguno de ellos se entiende completamente. Se describen varios efectos, entre los que se incluyen la adhesión, la coagregación, la inhibición competitiva, la producción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y compuestos similares a bacteriocinas, la caracterización de su entorno mediante la modulación del pH y/o el potencial de oxido-reducción comprometiendo así la capacidad de los agentes patógenos para establecerse, además, de estimular la inmunidad innata y modular la respuesta inmune celular y humoral (Erickson, Hubbard, 2000; Teughels et al., 2008). Sin embargo, las bacterias probióticas no pueden colonizar la cavidad oral de forma permanente, por lo que se requiere una ingesta regular y casi diaria.

Dicho de otra forma, los beneficios de las cepas probióticas es que interfieren la biopelícula oral, modulando la ecología y disminuyendo el crecimiento de bacterias patógenas productoras de ácidos orgánicos, manteniendo así el pH de la placa y la saliva en un estado de equilibrio (Teughels et al., 2008).

En relación con la administración sistémica de los probióticos en contraparte con un uso local/tópico, se pone en evidencia que, al requerir una ingesta prácticamente diaria, el consumo en su formato sistémico se vuelve más factible, aún más, cuando los vehículos para su administración pueden ser alimentos básicos como, leche, queso, yogurt, etc. Por otra parte, la estimulación del sistema inmune se ha estudiado mayormente en administración sistémica de probióticos (Zoumpopoulou, 2017; Seminario-Amez, 2017; Villavicencio et al., 2018).

2.7 Modelo *in situ* de caries

La caries dental se entiende como la destrucción localizada de los tejidos duros del diente debido al subproducto ácido de la fermentación bacteriana de los carbohidratos de la dieta (Fejerskov y Kidd, 2008). Para poder estudiar esta patología actualmente existen varios tipos de modelos que se pueden aplicar para obtener respuestas a preguntas de investigación, entre ellos se pueden mencionar, modelos *in situ*, *in vivo* e *in vitro* (Kuper et al., 2015). En un intento por tratar de aproximar la situación clínica de la caries dental surgen los modelos *in situ* cuyo método intermedio entre ensayos clínicos y experimentos de laboratorios aportan muchas ventajas debido a su forma de implementación. Los ensayos clínicos generalmente ofrecen el nivel más alto de evidencia científica, pero para lograr aquello se necesita un gran número de sujetos y un extenso periodo de tiempo para determinar a cabalidad el efecto de alguna determinada intervención (Young-Hye Sung et al., 2014; Askar et al., 2017). Los modelos *in situ* de caries para poder lograr un importante grado de relevancia clínica deben simular las condiciones de la cavidad oral en forma no controlada, para lo cual, se deben incorporar parámetros experimentales altamente estandarizados. En estos modelos de estudio se requiere un número relativamente pequeño de

participantes, sin embargo, un alto grado de cumplimiento de los protocolos establecidos previamente para resolver la pregunta clínica específica de manera práctica (Young-Hye Sung et al., 2014).

2.8 Planteamiento del problema

Considerando que la caries dental es un problema de salud pública debido a su alta prevalencia y a las consecuencias que genera en la cavidad oral surge la necesidad de prevenir con mayor eficacia la ocurrencia de esta enfermedad y el uso de probióticos podría ser una opción terapéutica que complementa los tratamientos preventivos clásicos. Dado lo anterior este trabajo de investigación propone estudiar el efecto del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* administrado en formato sistémico sobre la densidad mineral, dureza superficial y morfología superficial de bloques de esmalte insertos en un modelo *in situ* de caries para determinar de mejor forma su efecto benéfico/protector frente a procesos de desmineralización.

III. HIPÓTESIS

Existen diferencias en la dureza superficial, densidad mineral y morfología superficial de bloques de esmalte insertos en un modelo *in situ* de caries luego de la exposición de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formato sistémico comparado con bloques de esmalte expuestos exclusivamente a sacarosa.

IV. OBJETIVO GENERAL

Establecer las diferencias en la dureza superficial, densidad mineral y morfología superficial de bloques de esmalte de un modelo *in situ* de caries luego de la exposición de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formato sistémico comparado con bloques de esmalte expuestos exclusivamente a sacarosa.

V. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la dureza superficial, densidad mineral y la morfológica superficial de los bloques de esmalte en un grupo expuesto a probiótico en formato sistémico.
2. Determinar la dureza superficial, densidad mineral y la morfológica superficial de los bloques de esmalte en un grupo no expuesto a probiótico en formato sistémico.
3. Comparar la dureza superficial, densidad mineral y morfología superficial entre el grupo expuesto al probiótico en formato sistémico y el grupo no expuesto a probiótico en formato sistémico

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Este proyecto se rigió por los principios de la Declaración de Helsinki, y cuenta con la aprobación del comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (ACTA N°2016/30) (Anexo 1).

6.1 Diseño experimental

El modelo *in situ* de caries consistió en 14 sujetos voluntarios que utilizaron un dispositivo intraoral por 14 días que sirvió de plataforma para 5 bloques de esmalte humano que se prepararon y montaron en el aparato removible. La construcción de la muestra correspondió a los bloques de esmalte insertos en el dispositivo intraoral. Los voluntarios usaron el aparato con 5 bloques de esmalte, los cuales se encontraban protegidos por acrílico con un espacio de 1 mm para la acumulación de placa o biopelícula (Cury JA et al.,1997), al bloque de esmalte ubicado en palatino del aparato se le cubrió la mitad con esmalte para uñas (*Colorama*) para aislarlo del medio oral. Los voluntarios debieron utilizar los aparatos día y noche, solamente retirarlo de boca durante los momentos de higiene oral, alimentación y para aplicar los tratamientos indicados que dependieron del grupo de experimentación correspondiente. Los voluntarios fueron asignados a 2 grupos de experimentación en forma aleatoria con la función aleatorio de *Excel office 2012*.

Los voluntarios, que firmaron un consentimiento informado (Anexo 2), fueron seleccionados de acuerdo con los siguientes criterios. Criterios de inclusión: Sujetos sistémicamente sano, no fumadores, libres de enfermedad gingivo periodontal comprobado mediante examen periodontal básico, libres de caries sin tratar (C=0), máximo 2 obturaciones (O=2) y sin pérdida de dientes (P=0) Criterios de exclusión: Que el individuo se haya sometido a tratamientos antibióticos o antisépticos bucales en un plazo de seis meses anteriores a la fecha de inclusión

en el estudio, que presente alteraciones en el flujo salival, consumo de fármacos, intolerancia a los materiales de estudio (acrílico) y uso de plano de relajación.

6.2 Construcción de la muestra

Para el cálculo del tamaño de muestra, se decidió que el tamaño de muestra que se ajusta mejor al modelo se lograba cuando se utilizaba la medición de microdureza superficial. Se consideró un riesgo *alfa* de 0,05 y un riesgo *beta* de 0,2 en un contraste bilateral. Se asume que la desviación estándar común de 15,3 (Salehzadeh E y cols., 2105), con una tasa de pérdidas de seguimiento del 5%, y un poder estadístico de 80 %. Se precisan 18 unidades de observación en cada grupo para detectar una diferencia igual o superior a 15 unidades de microdureza Vickers. El número final de unidades de observación por grupo fue de 42.

6.3 Obtención y almacenamiento de los dientes

Se recolectaron 40 terceros molares incluidos que fueron donados voluntariamente por pacientes con indicación de extracción mediante un consentimiento informado (Anexo 3). Los molares se mantuvieron en solución de Timol 0,1% pH 7, por un mes (Cury JA et al.,1997). Para luego ser sometidos a autoclave a vapor por 60 min a 120°C para asegurar su esterilización.

6.4 Preparación de los bloques de esmalte

Los bloques vestibulares y palatinos se obtuvieron mediante el corte de los terceros molares incluidos con un disco diamantado. Se utilizó solamente el tercio medio de la corona del diente, descartándose las raíces y el tercio oclusal (Figura 1). Se obtuvieron 72 bloques vestibulares de 3x3x3 mm y 18 bloques palatinos de 6x3x3 mm.

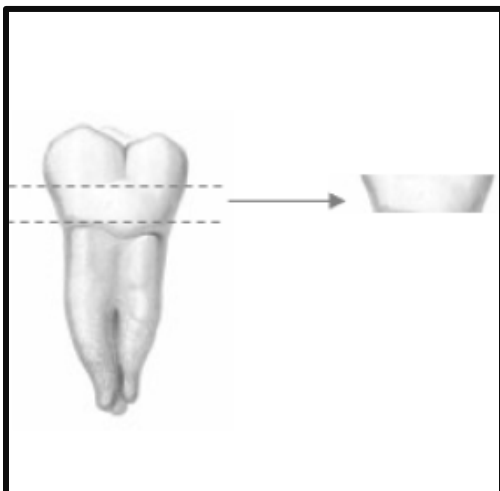


Figura 1. Esquema muestras de esmalte. Utilización de tercio medio coronal.

6.5 Obtención y diseño del dispositivo intraoral

Se tomaron impresiones con alginato del maxilar de los voluntarios con cubetas stock y luego fueron enviadas a un laboratorio dental donde se realizaron los dispositivos intraorales con acrílico de termopolimerización. Los dispositivos constaban de dos plataformas de acrílico en la zona vestibular de los molares superiores y una plataforma de acrílico en la zona de las rugas palatinas las que dieron sostén a los bloques de esmalte anteriormente descritos. El dispositivo constó de 4 ranuras de 4x4x4 mm en donde dos de ellas se alojaban en la plataforma vestibular derecha y las otras dos en la plataforma vestibular izquierda, y 1 ranura de 7x4x4 mm al centro de la plataforma palatina (Figura 2).



Figura 2. Dispositivo intraoral con bloques de esmalte. Aparato utilizado por los voluntarios.

6.6 Fase clínica de los grupos experimentales

La experimentación constó de dos grupos de 7 personas cada uno; grupo expuesto a probiótico y sacarosa y el grupo control expuesto a sacarosa y no al probiótico. Ambos grupos debieron aplicar a cada una de las muestras ubicadas en palatino y vestibular, una gota de sacarosa al 20% (Aires y cols., 2006), como desafío cariogénico, cada 2 horas hasta lograr 8 aplicaciones diarias (Cury y cols., 1997). La aplicación se realizó mediante un gotario fuera de boca y se debió volver a introducir el dispositivo de forma inmediata.

El grupo A expuesto al probiótico de manera sistémica debió retirar el dispositivo intraoral de la boca e ingerir una dosis de 150 mL de agua en la que se suspendió una dosis liofilizada de *Lactobacillus rhamnosus* SP1 (Sacco, Italia) en una concentración de 10^8 UFC/mL preparada dos horas antes de su ingesta. Luego debían enjuagarse vigorosamente con agua y volver a colocar inmediatamente el dispositivo en boca. Por otra parte, el grupo B no recibió ningún tratamiento sobre sus superficies de esmalte, solo, debía cumplir con el desafío cariogénico (Figura 3).

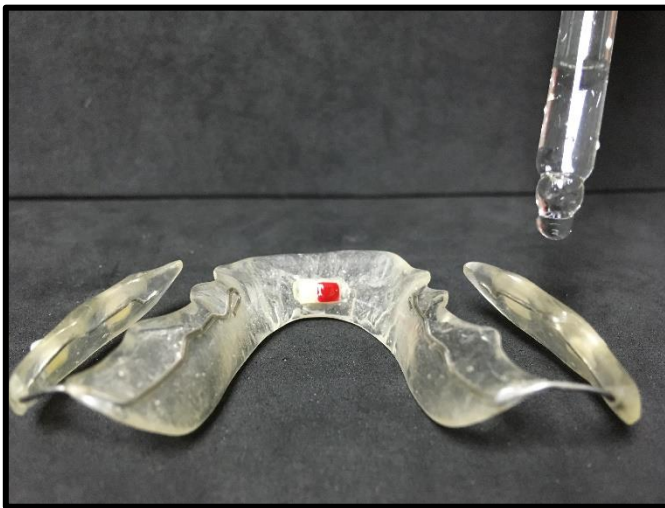


Figura 3. Desafío cariogénico. Instilación de una gota de sacarosa al 20% cada 2 horas 8 veces al día sobre los bloques de esmalte.

A los voluntarios se les hizo entrega de un informativo con la totalidad de instrucciones sobre el uso y manejo del dispositivo intraoral (Anexo 4). Además, recibieron en forma impresa los protocolos de aplicación (Anexo 5) de los tratamientos según el grupo experimental que les correspondía y las dudas fueron resueltas en forma oral. El compromiso y cumplimiento de los voluntarios se midió mediante una encuesta principalmente aplicada a la aplicación de sacarosa y el consumo del probiótico, además, del uso del dispositivo intraoral (Anexo 6).

6.7 Microdureza superficial de Vickers (MSV)

Existen diferentes métodos para evaluar la desmineralización del diente, entre ellos encontramos métodos directos e indirectos, estos últimos son de carácter cuantitativos y pueden medir cambios en los parámetros físicos reales de los objetos a estudiar por lo que son altamente sensibles y fáciles de utilizar donde la microdureza de Vickers adquiere relevancia (Jabbarifar S, et al., 2011). Dado lo anterior, una vez terminado el proceso experimental de 14 días, se procedió a medir la dureza superficial de cada bloque de esmalte con el microindentador de Vickers Struers Duramin (USA) proporcionado por el Laboratorio de Ciencias de los Materiales de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Chile (Figura 4) en donde a los especímenes de esmalte se les penetró con una carga de 200 g (1,961 N) durante 10 segundos. Las indentaciones se realizaron aleatoriamente sobre la superficie de esmalte previa rehidratación de las muestras en Timol al 0,1% por 48 horas como mínimo. Se realizaron 5 mediciones en cada bloque de esmalte obteniendo de esta forma un promedio de dureza por superficie. Los valores de dureza fueron calculados por el equipo mediante la siguiente fórmula:

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

HV: microdureza de vickers

F: test de carga aplicada (N)

d: promedio de las diagonales de la indentación

(Majithia et al., 2016)

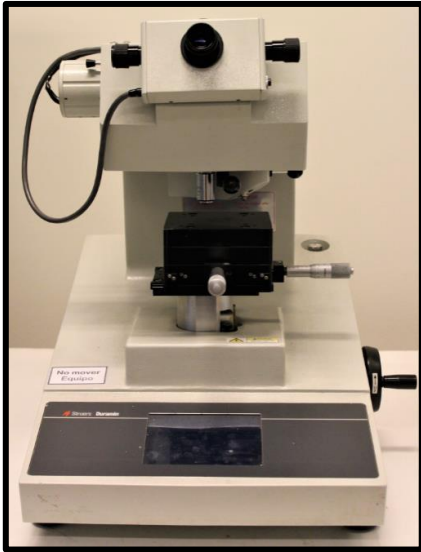


Figura 4. Microindentador de Vickers Struers Duramin (USA).

6.8 Microtomografía computarizada (Micro- CT) y densidad mineral

Este método permite obtener imágenes de forma no invasiva ni destructiva del objeto a estudiar permitiendo la visualización de cortes transversales los que se pueden volver a ensamblar tridimensionalmente mediante el procesamiento de un computador consiguiendo construir estructuras volumétricas (Irie et al., 2018; Boca et al., 2017). Entendiendo esto, luego del cumplimiento del desafío cariogénico de instilar una gota de sacarosa al 20% y el consumo del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formato sistémico por 14 días los bloques de esmalte fueron escaneados por la tomografía microcomputada de alta resolución SKYSCAN1272 de Bruker® ubicado en la Facultad de Ingeniería Civil Química de la Pontificia Universidad Católica. Las imágenes obtenidas se guardaron con el formato Tagged Image File Format (TIFF) las que luego se exportaron al software NRecon, Versión: 1.7.4.2; SkyScan para visualizar los cortes y las reconstrucciones volumétricas de los bloques de esmalte. Se utilizó el software CT Analyser versión 1.18.08 para la cuantificación de densidad mineral (DM) realizando un análisis solo al esmalte de las muestras. Los valores de densidad mineral (DM) se promediaron luego de hacer las mediciones por cada bloque de esmalte. Las imágenes se visualizaron en 3D y con codificación de colores mediante el programa DataViewer versión 1.5.6.2.

6.9 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes obtenidas por medio del microscopio óptico de barrido (SEM) se debe una compleja secuencia de detección, procesamiento y visualización de las señales que resultan luego de la interacción del haz de electrones con el objeto a estudiar permitiendo un gran campo de visión efectivo a una alta resolución espacial sin alterar la muestra estudiada (Potsaid y Bellouard, 2005). Dicho esto, la observación de la microestructura de los bloques de esmalte se realizó mediante el microscopio electrónico de barrido (JEOL Modelo JSM IT300LV) que se encuentra ubicado en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Las muestras se fijaron con glutaldehido al 2,5 % y en buffer cacodilato de sodio 0,1 M por 2 horas, luego fueron lavadas 3 veces por 5 minutos y secadas por aproximadamente 30 minutos. Luego fueron montadas en un portamuestras de aluminio para posteriormente ser metalizadas en oro (METALIZADOR DENTON VACUMN). Cada muestra fue expuesta a aumentos de 250X,1500X y 2000X en su plano transversal.

6.10 Análisis estadístico

Los datos fueron codificados e ingresados a una base de datos por un solo operador en archivo *Excel Office 2012* para *Windows*. Luego se traspasaron al programa T Test (Student's T-Test) para ser sometidos a análisis estadístico. Se desarrolló un análisis descriptivo de los datos de microdureza y densidad mineral de las muestras pertenecientes a cada grupo experimental. Se realizó una comparación de los datos entre los grupos de muestras control–probiótico, y sacarosa–probiótico. Las variables cuantitativas presentaron valores con Intervalo de confianza de un 95%. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas si el valor del *p-value* obtenido en el test es igual o menor a 0,05.

6.11 Recolección de dispositivos

La totalidad de los voluntarios completó el procedimiento experimental. No hubo pérdida de bloques de esmalte. Las muestras fueron retiradas de los dispositivos intraorales y almacenadas en tubo centrífuga tipo Eppendorf con Timol al 0.1% por 48 horas para rehidratar las muestras. Estos tubos fueron previamente rotulados según el grupo experimental (muestras expuestas al probiótico y a sacarosa; muestras expuestas solamente a sacarosa). A las muestras palatinas de ambos grupos experimentales se les retiró el esmalte de uña y se les realizó una incisión para identificar la mitad aislada del medio oral. Estas últimas fueron analizadas tanto por superficie aislada del medio oral como por superficie expuesta según grupo experimental. Finalmente, los bloques de esmalte fueron testeados en diferentes pruebas.

6.12 Pruebas de viabilidad y carga de *Lactobacillus rhamnosus*.

Para determinar el crecimiento y la concentración de probiótico a la que serían expuestos los voluntarios se realizaron pruebas de viabilidad y carga previo al inicio del procedimiento experimental sembrando 100 μ L de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en placas de agar MRS a distintas diluciones y en distintos tiempos (t_0 : inmediatamente; t_1 : 20 minutos; t_2 : 1 hora; t_3 : 2 horas) todo en duplicado. Las placas fueron incubadas por 48 horas a 37° en capnofilia. En el control de viabilidad se pudo observar crecimiento de colonias en todos los cuadrantes de todas las placas MRS sembradas en distintas diluciones y tiempos. Como se puede ver en las Figuras 5 y 6 en las placas de agar MRS el crecimiento de colonias es compatible con la morfología descrita para *Lactobacillus rhamnosus*. Con respecto a la carga se observó que en el tiempo 3 (2 horas) el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en la dilución 10^{-7} es de 7 lo que se traduce en una concentración de 10^8 UFC/mL tal como dice el fabricante (Figura 7). En la observación al microscopio óptico del frotis realizado desde colonias aisladas de placas de agar MRS se observaron células bacilares de tamaño intermedio agrupadas en pares o en cadenas (Figura 8).

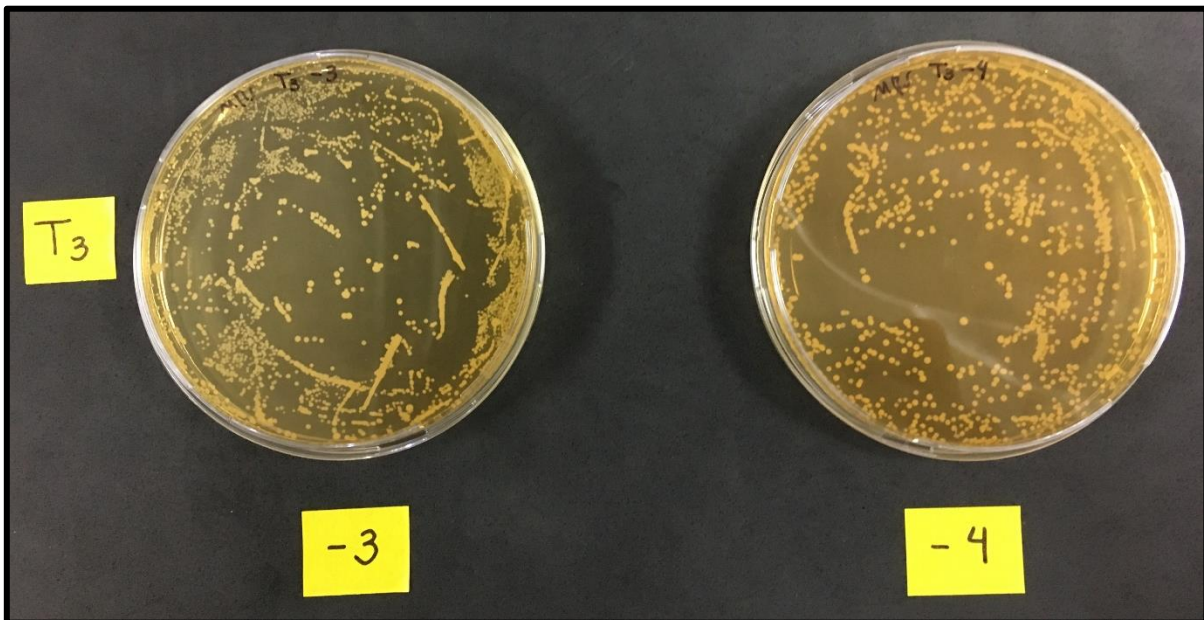


Figura 5. Imagen de placas de agar MRS utilizadas como control de viabilidad y carga. Siembra realizada en diluciones 10^{-3} y 10^{-4} en tiempo 3

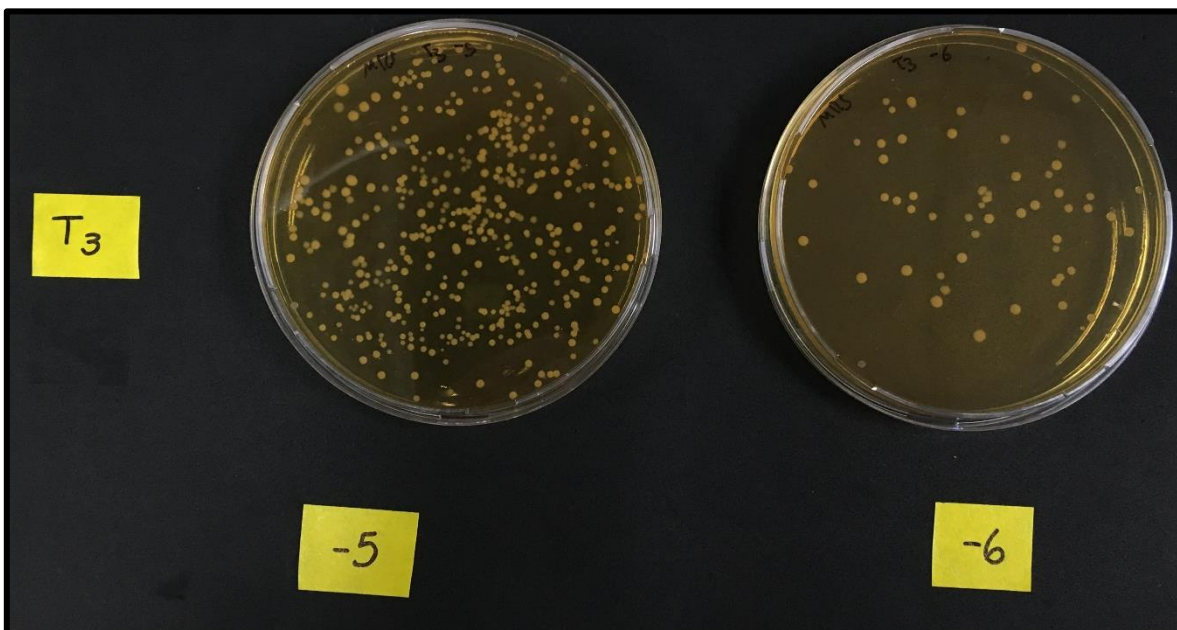


Figura 6. Imagen de placas de agar MRS utilizadas como control de viabilidad y carga. Siembra realizada en diluciones 10^{-5} y 10^{-6} en tiempo 3

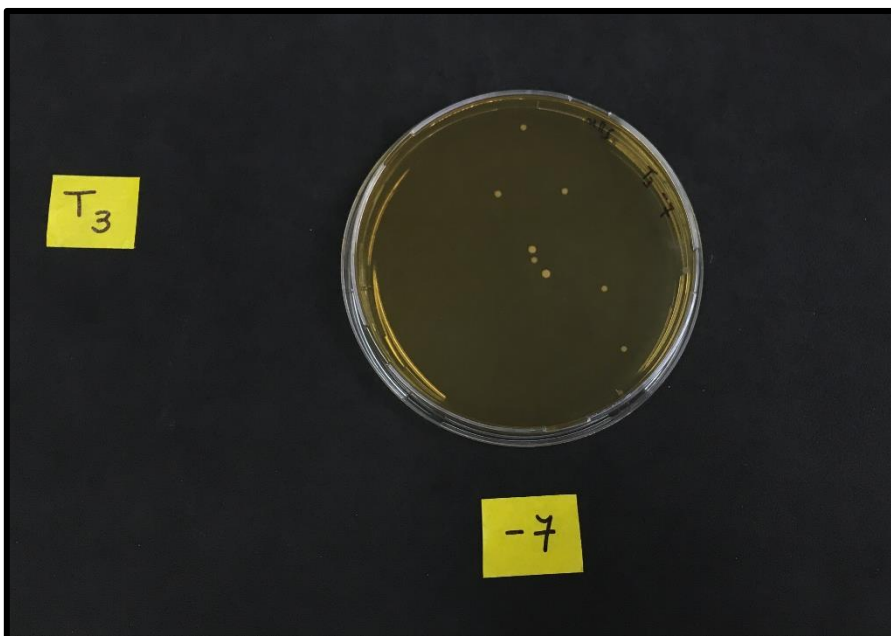


Figura 7. Imagen de placa de agar MRS sembrada y cultivada a 10^7 . Recuento de UFC en tiempo 3

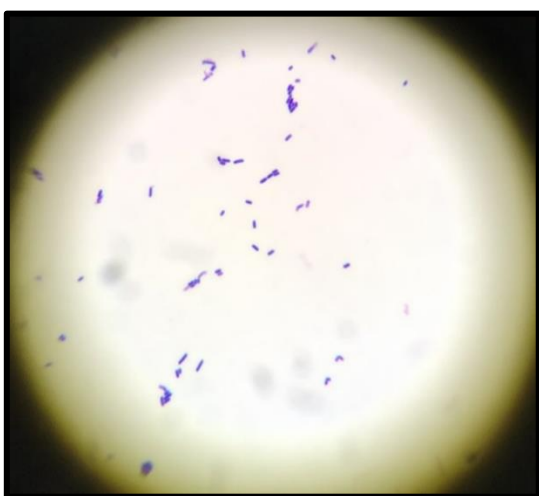


Figura 8. Imagen de microscopio óptico 100X. Frotis de colonia aislada crecida en agar MRS

VII. RESULTADOS

7.1 Caracterización demográfica y clínica.

La tabla 1 muestra la caracterización demográfica, periodontal y COPD de la totalidad de los voluntarios que participaron en este procedimiento experimental visualizando género, edad, EPB y COPD.

Voluntario	Género	Edad	EPB	COPD
1.1	M	24	1	1 (O)
1.2	F	25	1	0
1.3	M	23	1	0
1.4	M	24	1	0
1.5	F	24	0	1 (O)
1.6	F	25	0	0
1.7	F	25	0	1 (O)
2.1	F	25	0	1 (O)
2.2	M	27	1	0
2.3	M	22	1	1 (O)
2.4	F	27	0	0
2.5	M	25	0	0
2.6	F	25	0	0
2.7	M	24	0	1 (O)

Tabla 1. Caracterización demográfica y periodontal. F (Femenino) y M (Masculino).

7.2 Medición de microdureza superficial de Vickers.

El gráfico 1 (Figura 9) muestra los promedios de las mediciones de dureza superficial de los bloques de esmalte sometidos al probiótico *Lactobacillus rhamnosus* y sacarosa; bloques sometidos solamente a sacarosa y bloques aislados del medio oral (control).

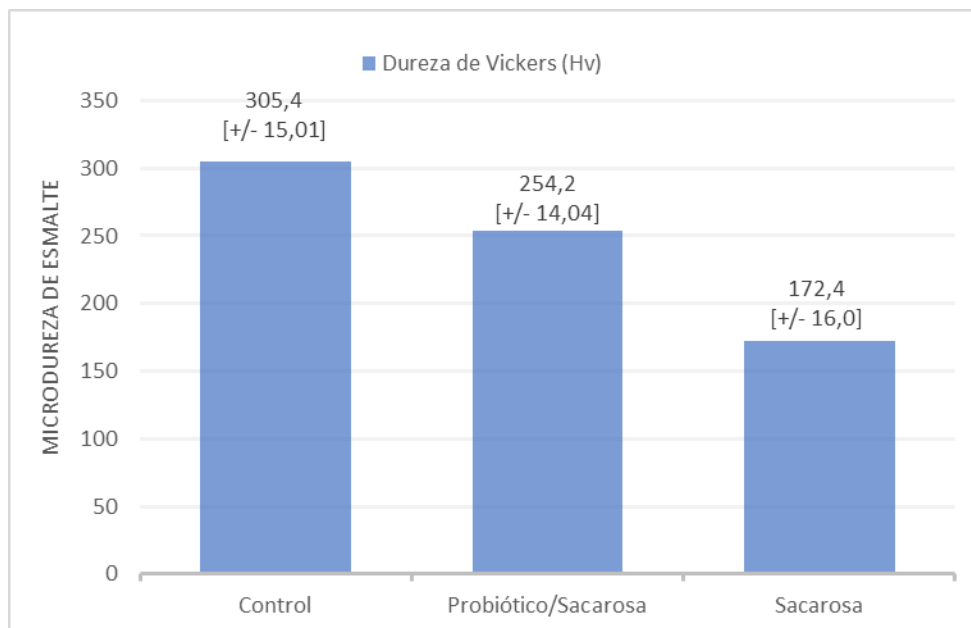


Figura 9. Gráfico 1. Promedios de dureza superficial de los bloques de esmalte según grupo experimental. Los valores entre corchetes representan las desviaciones estándar (DE \pm). Los valores promedios de dureza superficial son distintos entre los 3 grupos de muestras (Grupo muestras Control; 305,4 \pm 15,01 MSV, Grupo muestras S/P; 254,2 \pm 14,04 MSV, Grupo muestras Sacarosa; 172,4 \pm 16,0 MSV).

El mayor valor promedio de dureza superficial pertenece al grupo de las muestras aisladas del medio oral (control) seguido del grupo expuesto al probiótico *Lactobacillus rhamnosus* y sacarosa, siendo el de menor valor el grupo sometido a sacarosa. Al comparar los valores promedios entre los diferentes grupos experimentales mediante T-Test se observó una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) entre el grupo de muestras control (aisladas del medio oral) y las muestras expuestas al probiótico *Lactobacillus rhamnosus*. Por otra parte, el valor promedio del grupo expuesto al probiótico/sacarosa comparado con los valores pertenecientes al grupo sacarosa también presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) (tabla 2).

Grupo experimental	Valor promedio dureza	DE	Valor <i>P</i> entre grupo C - P/S	Valor <i>P</i> entre grupo P/S - S
Control (C)	305,4	15,01	<i>P</i> < 0,05	
Probiótico/Sacarosa (P/S)	254,2	14,04		<i>P</i> < 0,05
Sacarosa (S)	172,4	16,0		

Tabla 2. Análisis comparativo entre los promedios de los distintos grupos experimentales, desviaciones estándar y valores de significancia.

7.3 Imágenes obtenidas a partir de micro-CT y densidad mineral.

Los bloques de esmalte palatinos fueron seleccionados y posteriormente escaneados por el micro CT obteniendo imágenes que nos permitieron visualizar la superficie control y la superficie expuesta según el grupo experimental (probiótico/sacarosa y sólo sacarosa). En un corte axial de los bloques de esmalte se utilizó un código de colores para visualizar las densidades minerales y su distribución en el esmalte dental sometido a los distintos grupos experimentales. El análisis de las muestras palatinas se realizó en forma separada tanto de la superficie control (aislada del medio oral) y la superficie expuesta a probiótico/sacarosa o solo a sacarosa según sea el caso. En la imagen en escala de grises y colorificada obtenida desde el bloque palatino del grupo experimental probiótico/sacarosa se pudo observar una discreta área de desmineralización correspondiente al área expuesta (Figura 10.b.d) mientras que, al comparar con su contraparte, la zona de control no se evidenció mayores alteraciones comparativamente (Figura 10.a.c). Por otra parte, en la imagen del bloque palatino del grupo experimental sacarosa en la superficie expuesta al medio se pudo apreciar una mayor área de desmineralización (Figura 11.b.d) en oposición a su área control (Figura 11.a.c).

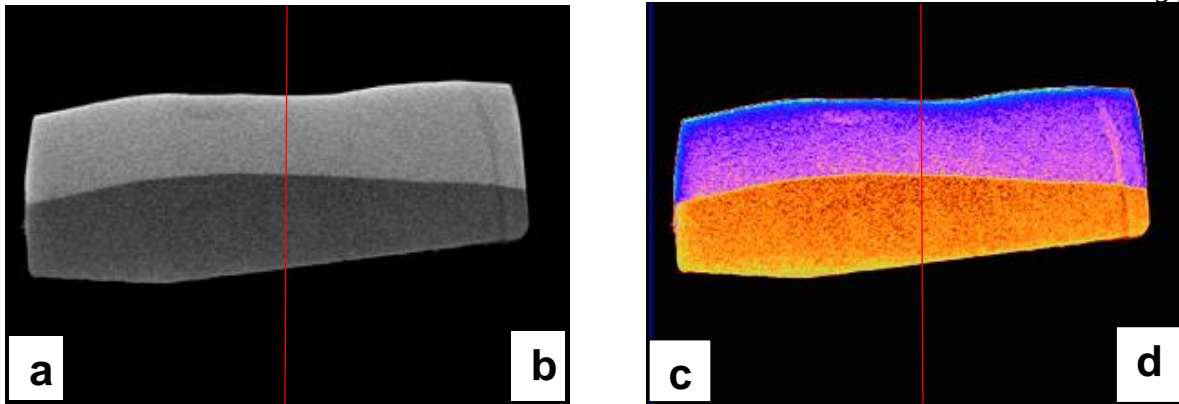


Figura 10.a.b y 10. c.d. Imagen micro CT muestra palatina del grupo probiótico-sacarosa en escala de grises y colorificada. Los recuadros 10a y 10c corresponden a la zona control sin exposición al medio oral mientras que los recuadros 10b y 10d corresponden a la zona expuesta al probiótico *Lactobacillus rhamnosus* y sacarosa.

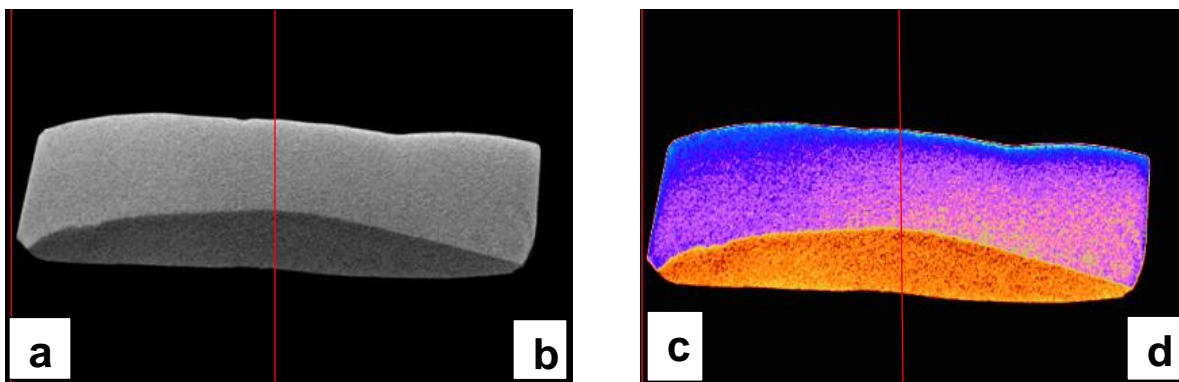


Figura 11.a.b y 11.c.d Imagen micro CT muestra palatina del grupo sacarosa en escala de grises y colorificada. Los recuadros 11a y 11c corresponden a la zona control sin exposición al medio oral mientras que los recuadros 11b y 11d corresponden a la zona expuesta a sacarosa.

7.4 Resultados de mediciones de densidad mineral

En los promedios de densidad mineral para los distintos grupos experimentales se observa una clara diferencia entre ellos. El promedio de densidad mineral para las muestras de esmalte que fueron expuestas a probiótico y sacarosa es de 2,41 gr/cm^3 , el grupo experimental expuesto a sacarosa promedio un valor de densidad de 2,21 gr/cm^3 , mientras que el promedio más alto de densidad mineral

corresponde a los bloques de esmalte aislados del medio oral (control) con 2,54 gr/cm³. Con respecto a dichos promedios se observa una diferencia significativa entre la densidad mineral del grupo probiótico/sacarosa y sacarosa ($P < 0.05$). Además, también se evidencia una diferencia significativa entre los promedios de las muestras aisladas al medio oral (control) y el grupo experimental probiótico/sacarosa ($P < 0.05$).

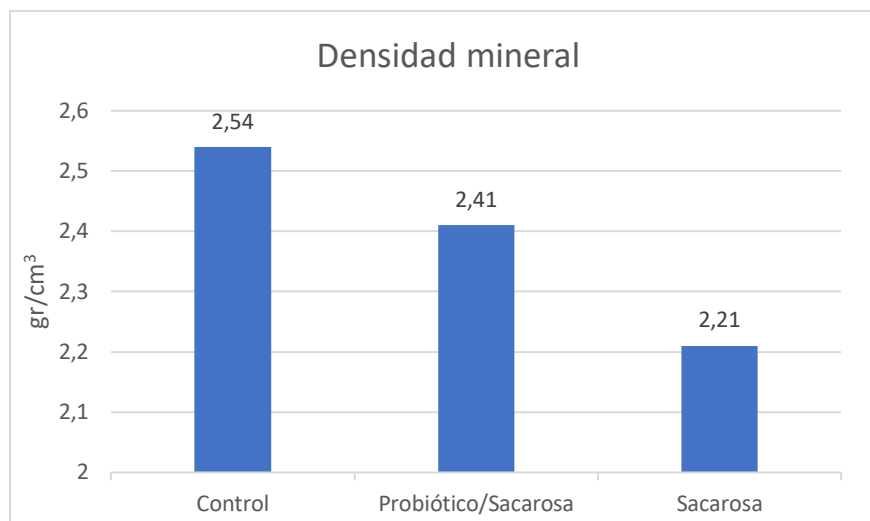


Figura 12. Gráfico 2. Promedios de densidad superficial de los bloques de esmalte según grupo experimental.

7.5 Microscopia electrónica de barrido (SEM): Morfología superficial.

Se visualizaron los bloques de esmalte mediante el microscopio electrónico de barrido para observar los cambios morfológicos presentes en la superficie de los bloques de esmalte de los diferentes grupos experimentales. Se tomaron las imágenes más representativas con el fin de poder realizar una comparación sobre su morfología superficial. La figura 13 muestra la imagen de un bloque de esmalte control en donde la superficie a distintas magnificaciones se ve regular y sin porosidades. A su vez, en la figura 14 expuesta al probiótico *Lactobacillus rhamnosus* y sacarosa se observa una mayor porosidad e irregularidades espacialmente en el recuadro b y c. Finalmente, en la figura 15 se muestra la imagen de un bloque de esmalte del grupo experimental sacarosa que presenta la

morfología superficial más porosa y con mayores irregularidades del grupo tal como se visualiza en el recuadro c.

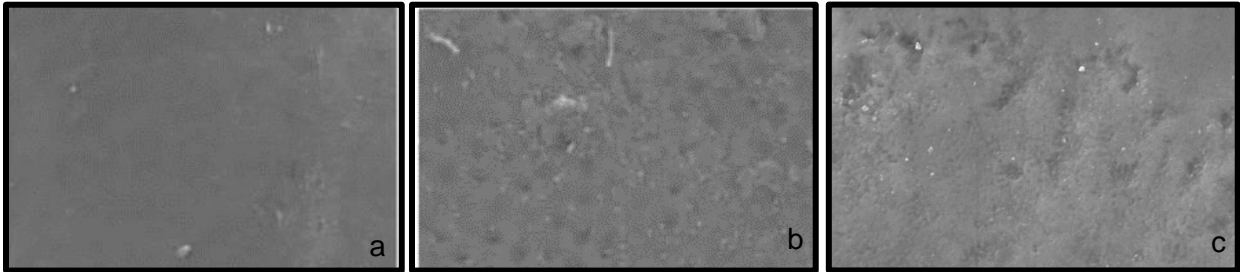


Figura 13. Imágenes obtenidas mediante SEM de muestras control. El recuadro a muestra un bloque de esmalte con una magnificación de 250x, el recuadro b con 1000x y el recuadro c con 2000x.

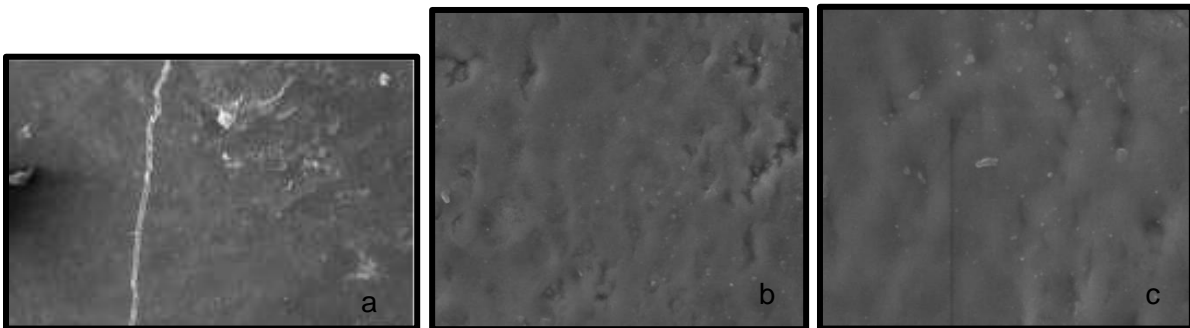


Figura 14. Imágenes obtenidas mediante SEM de muestras probiótico/sacarosa. El recuadro a muestra un bloque de esmalte con una magnificación de 250x, el recuadro b con 1000x y el recuadro c con 2000x.

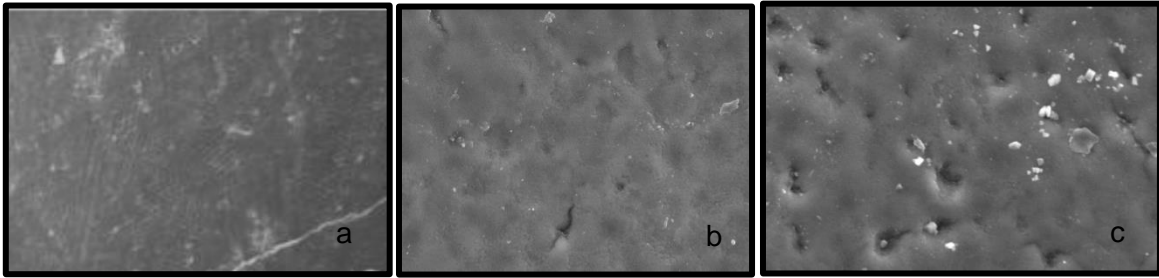


Figura 15. Imágenes obtenidas mediante SEM de muestras sacarosa. El recuadro a muestra un bloque de esmalte con una magnificación de 250x, el recuadro b con 1000x y el recuadro c con 2000x.

VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo de investigación mediante un modelo *in situ* de caries se expuso a un conjunto de 14 voluntarios a la ingesta del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formato sistémico durante 14 días. Los bloques de esmalte insertos en el dispositivo intraoral se sometieron a una serie de pruebas entre las que destacan la medición de microdureza, el análisis de densidad mineral y la visualización de la morfología superficial para evaluar de esta forma el efecto del probiótico administrado en formato sistémico.

Debido a la complejidad de los ensayos controlados aleatorizados por su gran número de participantes y el largo período de seguimiento es que los modelos *in situ* surgen como una gran alternativa superando en relevancia clínica a los estudios *in vitro*. En los modelos *in situ*, un grupo de voluntarios debe utilizar un dispositivo intraoral con especímenes de esmalte, en donde los resultados de la investigación pueden ser testeados en ellos (Hollanders, 2018). De esta manera, se pueden estudiar las hipótesis de investigación de manera práctica sorteando las dificultades derivadas de otros tipos de estudios (Zero, 1995). En la implementación de modelos *in situ* hay múltiples variables experimentales que se deben tomar en cuenta, es por esto, que el cumplimiento estricto de los protocolos contruídos y definidos al inicio del proceso experimental para responder la pregunta clínica es de suma importancia (Young-Hye Sung et al., 2014). La elección en este estudio tanto del número de bloques de esmalte, la duración del estudio y la cantidad de voluntarios radica en que dichos valores fueron utilizados en la mayoría de las investigaciones donde se estudió satisfactoriamente la caries dental con un modelo *in situ* (Sa 2013; Arruda 2012; Higham 2005).

La medición de microdureza es un método confiable para obtener información sobre los cambios que ocurren con el contenido mineral del esmalte cuando se enfrenta a procesos de desmineralización, en donde, la profundidad de la penetración es el parámetro objetivo a estudiar (Mandava 2017). Los resultados de microdureza en este estudio revelan que el valor promedio de las muestras de esmalte expuestas al probiótico y sacarosa es superior al promedio de los bloques de esmalte que solo fueron expuestos a sacarosa llegando esta diferencia a ser

estadísticamente significativa lo que indica que el probiótico posee una acción favorable en contra de la desmineralización. Por otra parte, al comparar los valores entre las muestras que fueron aisladas del medio oral (control) con las expuestas al probiótico y sacarosa, también se presenta una diferencia estadísticamente significativa, resultado que sugiere que la administración sistémica del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* y su efecto protector frente a la desmineralización es efectivo pero limitado debido a que no logra evitar totalmente la pérdida de minerales del esmalte pero que tiende a disminuirla considerablemente obteniendo valores intermedios entre los bloques de esmalte aislados del medio oral (control) y los expuestos exclusivamente a sacarosa. Los valores de la microdureza para los bloques de esmalte que fueron aislados del medio oral son similares a los obtenidos por Wongkhantee (2006).

Para comparar nuestros resultados, en la literatura solo existe 1 estudio que reporta haber utilizado un modelo *in situ* de caries para probar el efecto de los probióticos. Lodi et al en 2015 realizaron un estudio con un modelo *in situ* de caries el cual contemplaba que 10 voluntarios utilizaran un dispositivo intraoral con 4 especímenes de esmalte bovino, como desafío cariogénico sacarosa al 20%, y expuestos a leches fermentadas suplementadas con probióticos. La leche A contenía *Lactobacillus casei* y la leche B *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium spp.*, y *Lactobacillus paracasei*. La aplicación del probiótico se administraba de manera tópica fuera de boca por 5 minutos. En la prueba de microdureza se registraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras expuestas a sacarosa y las expuestas a la leche B, en donde este último grupo promedió valores mucho más altos que el grupo expuesto a sacarosa. La similitud de los valores promedios de dureza entre ambos estudios indica que vía de administración del probiótico ya sea de forma tópica o de manera sistémica no influye mayormente en los resultados de dureza superficial por lo que su modo de aplicación no debiera generar diferencias al momento de evaluar o medir su efecto protector desplazando la discusión a comprender molecularmente su mecanismo de acción. Por otra parte, cabe destacar que tanto el vehículo como las cepas

utilizados en dicho estudio fueron distintos a los empleados en este trabajo de investigación.

La elección de la cepa probiótica utilizada en este estudio se basa en la evidencia científica publicada anteriormente donde *Lactobacillus rhamnosus* exhibió propiedades interesantes contra bacterias cariogénicas en ensayos clínicos randomizados, logrando disminuir las caries en los voluntarios que fueron expuesto a él (Rodríguez 2016; Stecksén-Blicks 2009; Näse 2007). Sin embargo, aún no está claro la dosis exacta, el tiempo efectivo de tratamiento ni el vehículo ideal para llevar a cabo los procedimientos experimentales y maximizar el efecto protector (Seminario-Amez 2017).

Con respecto a las imágenes obtenidas por microtomografía computada (Micro-CT), estas nos permiten estudiar de forma volumétrica y no destructiva los bloques de esmalte sometidos al proceso experimental, entregando resultados tanto cuantitativos como cualitativos. En los bloques de esmalte se pudo observar una región de desmineralización correspondiente a la mitad externa del esmalte expuesto lo que se asemeja a las imágenes obtenidas por Shahmoradi (2017) y Alyahya (2019) en sus respectivas investigaciones.

En este estudio, las imágenes obtenidas de los bloques de esmalte evidenciaron una mayor desmineralización de la mitad externa del esmalte en aquellos bloques que fueron expuestos solamente a sacarosa en comparación con los que se expusieron tanto al probiótico como a sacarosa. Con respecto a los resultados de densidad mineral, las muestras que fueron aisladas del medio oral obtuvieron los valores más altos de densidad mineral seguidos por los bloques que fueron expuestos al probiótico y a sacarosa, para terminar con los que fueron expuestos solamente a sacarosa. El valor de densidad mineral para las muestras control (bloques de esmalte aislados del medio oral) fue similar a los obtenidos por Alyahya (2019), Shahmoradi (2017) y Huang (2007). Tanto el grado de desmineralización como los valores de densidad mineral hacen inferir que los probióticos tienden a poseer un efecto protector sobre el esmalte dental disminuyendo la desmineralización, consiguiendo de esta manera, una mayor

conservación de las propiedades estructurales del esmalte. No obstante, de aquello, los resultados reflejan que el probiótico administrado de manera sistémica no logra inhibir la desmineralización a cabalidad teniendo un efecto parcial e intermedio. Actualmente no existe evidencia científica que haya vinculado mediante microtomografía computada (Micro-CT) la potencialidad de los probióticos sobre superficies de esmalte, por lo mismo, se abre una nueva posibilidad de estudiar los beneficios probióticos de una manera mínimamente invasiva.

Por su parte, mediante el análisis del microscopio electrónico de barrido (SEM) la morfología superficial de los bloques de esmalte sometidos a la exposición tanto del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* como de sacarosa muestra una menor pérdida de tejido mineral en comparación con el grupo expuesto a sacarosa y no al probiótico, visualizándose el esmalte en este último grupo poroso e irregular. Estos resultados son similares con los presentados por Nadelman (2017) que mediante microscopía electrónica de barrido observó que las superficies de los bloques de esmalte expuestas a leche fermentada y leche fermentada suplementada con probióticos mostraron una menor pérdida de minerales comparados con el grupo control en un estudio *in vitro*.

Existe una estrecha correlación entre la medición de dureza, medición de densidad mineral y morfología superficial de bloques de esmalte. Los resultados entregados por el análisis de microdureza de los bloques de esmalte indicaron que el grupo expuesto a probiótico/sacarosa promedió valores de dureza mayores que el grupo que no fue expuesto al probiótico, correspondiéndose esto, con los resultados de la microtomografía computada y las imágenes obtenidas por el SEM lo que se traduce en un esmalte con una microarquitectura mayormente debilitada en los grupos que no fueron expuestos al probiótico *Lactobacillus rhamnosus*.

Este trabajo de investigación demostró que el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* administrado en forma sistémica protegió al esmalte de la desmineralización en un modelo *in situ* de caries. Sin embargo, el efecto benéfico del probiótico no logró inhibir completamente el proceso de desmineralización, lo que puede ser atribuido

entre otras cosas al reducido conocimiento sobre el mecanismo de acción con que los probióticos actúan en cavidad oral desconociendo cuál es la vía de administración más conveniente para obtener el máximo efecto protector. Además, tampoco existe respaldo científico sobre la dosis exacta, el tiempo de tratamiento ideal para lesiones de caries, el vehículo indicado ni mucho menos la cepa probiótica óptima por lo que determinar estas variables mediante investigaciones venideras sería fundamental para precisar la verdadera potencialidad que hay detrás de las bacterias probióticas en el control de las condiciones microbiológicas de la cavidad oral y su efecto sobre la enfermedad de caries.

IX. CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que existen diferencias estadísticamente significativas de los promedios de densidad mineral y microdureza superficial de los bloques de esmalte entre el grupo expuesto al probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en forma sistémica y sacarosa versus el grupo experimental solamente expuesto a sacarosa.

La morfología superficial del grupo experimental sacarosa es mucho más porosa e irregular que la del grupo expuesto tanto al probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formato sistémico y a sacarosa.

El probiótico *Lactobacillus rhamnosus* administrado en formato sistémico tiene un efecto benéfico/protector frente a los fenómenos de desmineralización.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Ahumada (2001). Lactobacilli Isolation from Dental Plaque and Saliva of a Group of Patients with Caries and Characterization of their Surface Properties.

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

Alyahya A, Alqareer A, Swain M (2019). Micro-CT Calibration Using Polymers and Minerals for Enamel Mineral Content Quantitation. *Med Princ Pract*

Arruda M, dos Santos H, Sundfeld H, Berger B, Briso AL (2012). Effect of hydrogen peroxide at 35% on the morphology of enamel and interference in the remineralization process: an *in situ* study. *Oper Dent*; 37:518-525.

Askar H, Tu K, Paris S, Yeh C, Schwendicke F (2017). Risk of caries adjacent to different restoration materials: Systematic review of in situ studies. 56:1-10

Badet C, Thebaud NB (2008). Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. *Open Microbiol J* 2(38-48).

Baird E, Taylor G (2017). X-ray micro computed-tomography. *Current Biology*, 27(8): R289–R291

Baldassarri M, Margolis C, Beniash E (2008). Compositional Determinants of Mechanical Properties of Enamel. *Journal of Dental Research*, 87(7): 645–649

Boca C , Truyen B , Henin L (2017). Comparison of micro-CT imaging and histology for approximal caries detection. *J Can Dent Assoc* 7 (1): 6680

Bonifait L, Chandad F, Grenier D (2009). Probiotics for oral health: myth or reality? *J Can Dent Assoc* 75(8):585-590.

Cagetti G, Mastroberardino S, Milia E, Cocco F, Lingström P, Campus G (2013). The use of probiotic strains in caries prevention: a systematic review. *Nutrients* 5(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.

Callister D (1995). Propiedades mecánicas de los materiales. En: *Introducción a la Ciencia e Ingeniería de los Materiales*. Editorial Reverté S.A., Barcelona; traducción de: William D. Callister, Jr., *Materials Science and Engineering, an Introduction*, 3ed. Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York, pp.136-140.

Chalas R, Szlązak K, Wójcik-Chęcińska I, Jaroszewicz J, Molak R, Czechowicz K, Paris S, Świążkowski W, Kurzydłowski KJ (2017). Observations of mineralised tissues of teeth in X-ray micro-computed tomography *J Can Dent Assoc* 76(2):143-148

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

Davidson L, Hoekstra S, Arends J (1974). Microhardness of sound, decalcified and etched tooth enamel related to the calcium content. *Caries Res* 8(2):135-144.

De Jong H, Van Der Hoeven S (1987). The Growth of Oral Bacteria on Saliva. *J Dent Res* 66 (2):498-505.

Deyyle H, Dziadowiec I, Kind L, Thalmann P, Schulz G, Müller B (2015). Mineralization of Early Stage Carious Lesions In Vitro – A Quantitative Approach. *Dent J* 3:111-122.

Díaz-Garrido N, Lozano C, Giacaman RA (2012). Frequency of sucrose exposure on the cariogenicity of a biofilm-caries model. *Eur J Dent* 10(3):345-350.

Dowd F (1999). Saliva and dental caries. *Dent Clin North Am.*43(4): 579–597

Duverger O, Beniash E., Morasso M (2016). Keratins as components of the enamel organic matrix. *Matrix Biology*, 52-54, 260–265.

Fejerskov O, Kidd EAM (2008). Dental caries : the disease and its clinical management. 2nd ed. Oxford: Blackwell Munksgaard.

Fejerskov O, Kidd E (2008). Chemical interactions between the tooth and oral fluids. In: Dental Caries. The Disease and its Clinical Management. 2nd rev ed. pp. 210-215.

Graves E, Berkowitz J, Proskin M, 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.

Gyurkovics M, Baumann T, Carvalho TS (2017). In vitro evaluation of modified surface microhardness measurement, focus variation 3D microscopy and contact stylus profilometry to assess enamel surface loss after erosive-abrasive challenges. *Apr* 5;12(4): e0175027

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

Higham M, Pretty A, Edgar M, Smith W (2005). The use of *in situ* models and QLF for the study of coronal caries. *J Dent*;33: 235-241.

Hollanders, Kuper K, Maske T, Huysmans (2018). Secondary Caries in situ Models: A Systematic Review. *Caries Research*, 454–462

Huang Y, Jones A, He L, Darendeliler A, Swain V (2007). Characterisation of enamel white spot lesions using X-ray micro-tomography. *Journal of Dentistry*, 35(9): 737–743.

Jabbarifar E, Salavati S, Akhavan A, Khosravi K (2011). Effect of fluoridated dentifrices on surface microhardness of the enamel of deciduous teeth. 8(3):113-7

Irie S, Rabelo D, Spin-Neto R, Dechichi P, Borges S, Soares P (2018). Use of Micro-Computed Tomography for Bone Evaluation in Dentistry. *Brazilian Dental Journal*, 29(3): 227–238.

Kamran R, Farooq W, Faisal MR, Jahangir F (2012). Clínica consequences of untreated dental caries assessed using PUFA index and its covariates in children residing in orphanages of Pakistan *BMC Oral Health.* ;17(1):108.

Kassebaum N, Smith A, Bernabé E, Fleming D, Reynolds A (2017). Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990–2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, *Injuries, and Risk Factors. Journal of Dental Research*, 96(4): 380–387.

Kawashita Y, Kitamura M, Saito T (2011). Early childhood caries. *International journal of dentistry* 2011(725320).

Kutsch V (2014). Dental caries: an updated medical model of risk assessment. *J Prosthet Dent.*;111(4):280-5

Kidd EA, Fejerskov O (2004). What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res* 83 Spec No C(C35-38).

Kuper N, Montagner F, van de Sande H, Bronkhorst M, Opdam. (2015). Secondary Caries Development in in situ Gaps next to Composite and Amalgam. *Caries Research*, 49(5): 557–563.

Lee H, Zimmerman J, N Custodio, W Xiao, Y Basiri, T Hatibovic-Kofman, (2013). Proteomic Evaluation of Acquired Enamel Pellicle during In Vivo Formation. *PLoS ONE*, 8(7): e67919.

Lin X. y cols (2017). Effect of probiotic lactobacilli on the growth of *Streptococcus mutans* and Multispecies Biofilms Isolated from Children with Active Caries. *Med Sci Monit*; 23: 4175-418151

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

Lodi S, Oliveira V, Brighenti I, Delbem C, Martinhon R (2015). Effects of probiotic fermented milk on biofilms, oral microbiota, and enamel. *Brazilian Oral Research*, 29(1): 01–01:29 (1): 01-01.

Longbottom C, Ekstrand K, Zero D, Kambara M (2009). Novel preventive treatment options. *Monographs in oral science* 21:156-163.

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

Marcenes W, Kassebaum J, 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.

Magurran E (2004). *Measuring Biological Diversity*. Oxford: Blackwell Publishing

Maheswari U, Raja J, Kumar A, Seelan G. Caries management by riskassessment: A review on current strategies for caries prevention and management. *J Pharm*

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

Mandava, J (2017). Microhardness and Penetration of Artificial White Spot Lesions Treated with Resin or Colloidal Silica Infiltration. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*.

Mark W, Rossetti J, Rieken W, Dewhirst, F, Borisy G (2016). Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(6): E791–E800

Marsh PD (2010). Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent Clin North Am* 54(3):441-454.

Mazhari F , Boskabady M , Moeintaghavi A , Habibi A (2018). The effect of toothbrushing and flossing sequence on interdental plaque reduction and fluoride retention: A randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* ;89(7):824-832.

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

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

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

MINSAL (2017) Plan Nacional de Salud Bucal 2018-2030, Chile. URL: https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/12/Plan-Nacional-Salud-Bucal-2018-2030-Consulta-P%C3%BAblica-20_12_2017.pdf

Nadelman P, Frazão M, Vieira T, Balthazar F, Andrade M, Alexandria K, Maia C (2017). The performance of probiotic fermented sheep milk and ice cream sheep milk in inhibiting enamel mineral loss. *Food Research International*, 97: 184–190

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

Neel E, Aljabo A, Strange A, Ibrahim S, Coathup M, Young A, Mudera V (2016). Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 11: 4743–4763.

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

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

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

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

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

Park S, Cho H, Lee P, Shon J (2011). Early caries detection using optical coherence tomography: a review of the literature. *J Korean Acad Conserv Dent* 2011;36:367-376

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 S (2001). A randomized clinical trial of the effect of yoghurt on the human salivary microflora. *Arch Oral Biol* 46(8):705-712.

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

Potsaid B, Bellouard Y, Wen T (2005). Adaptive Scanning Optical Microscope (ASOM): A multidisciplinary optical microscope design for large field of view and high resolution imaging. *Optics Express*, 13(17): 6504.

Priyadarshini H, Ramya R, Ashish S, Gautham S (2013) Effect of organic versus inorganic fluoride on enamel microhardness: An *in vitro* study. 16(3): 203–207.

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

Rosier T , De Jager M , Zaura E , Krom B (2014). Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet. *Front Cell Infect Microbiol.*;4:92

Sa Y, Sun L, Wang Z, Ma X, Liang S, Xing W, Jiang T, Wang Y (2011). Effects of two in-office bleaching agents with different pH on the structure of human enamel: an *in situ* and *in vitro* study. *Oper Dent* 2013;38:100-110.

Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB (2007). Dental caries. *Lancet* 369(9555):51-59.

Seminario-Amez M, Lopez-Lopez J, Estrugo-Devesa A, Ayuso-Montero R, Jane-Salas E (2017). Probiotics and oral health: A systematic review. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, 0–0

Shahmoradi M, Hunter N, Swain M (2017). Efficacy of Fluoride Varnishes with Added Calcium Phosphate in Protection of the Structural and Mechanical Properties of enamel. *Biomed Res Int* 2017:7834905.

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.

Stecksén-Blicks C, Sjöström I, Twetman S (2009). Effect of long-term consumption of milk supplemented with probiotic lactobacilli and fluoride on dental caries and general health in pre-school children: a cluster-randomized study. *Caries Res*. 43(5):374–381.

Takahashi N, Nyvad B (2008). Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res* 42(6):409-418.

Teruel J, Alcolea A, Hernández R, AJO (2015). Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Archives of Oral Biology*, 60(5): 768–775.

Teughels W, Van Essche M, Sliepen I, Quirynen M (2008). Probiotics and oral healthcare. *Periodontol 2000* 48(111-147).

Twetman S, Keller MK (2012). Probiotics for caries prevention and control. *Adv Dent Res* 24(2):98-102.

Villavicencio J, Villegas M, Arango C, Arias F. (2018). Effects of a food enriched with probiotics on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. salivary counts in preschool children: a cluster randomized trial.

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

Wefel S, Jensen E (1992). An intra-oral single-section demineralization/remineralization model. *J Dent Res* 71(Spec Iss):860-863.

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

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

Young-Hye S. (2014). How to design in situ studies: an evaluation of experimental protocols. *Aug*; 39(3): 164–171

White J, Faller V, Bowman D (1992). Demineralization and remineralization evaluation techniques: Added considerations. *J Dent Res*; 71:929–33

Wongkhantee S, Patanapiradej V, Maneenut C, Tantbirojn D (2006). Effect of acidic foods and beverages on the surface hardness of enamel, dentin and filling materials of tooth color. *Journal of Dentistry*, 34 (3): 214–220

Worawongvasu (2015). A Scanning Electron Microscopic Study of Enamel Surfaces of Incipient Caries. 39(6):408-12

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

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

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

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

Zhan L (2018). Rebalancing the Caries Microbiome Dysbiosis: Targeted Treatment and Sugar Alcohols. *Adv Dent Res.*;29(1):110-116

Zoumpopoulou G, Pot B, Tsakalidou E, Papadimitriou K (2017). Dairy probiotics: Beyond the role of promoting gut and immune health. *International Dairy Journal*, 67: 46–60.

XI. ANEXO 1: Acta de aprobación de protocolo de investigación



Ed-24 Agosto 2017

ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

INFORME N°:2016/30

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

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

Dr. Eduardo Fernández
Presidente CEC

Dr. Marco Cornejo
Vicepresidente CEC

Dra. Weronika Weil
Miembro Permanente CEC

Sra. Paulina Navarrete
Miembro Permanente CEC

Sr. Roberto La Rosa
Miembro Permanente CEC

Dr. Rodrigo Cabello
Miembro Permanente CEC

Dr. Alfredo Molina
Miembro Permanente CEC

Dra. Paola Llanos
Miembro Permanente CEC

Dr. Juan Estay
Miembro Permanente CEC

Sra. Rebeca Galarce
Representante de la Comunidad

Dra. Viviana Toro
Miembro Alterno CEC

Ed-24 Agosto 2017

2. Fecha de Aprobación: 03/05/2017

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

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

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

6. Fundamentación de la aprobación

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

RESPECTO A ASPECTOS METODOLÓGICOS:

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

RESPECTO A ASPECTOS JURIDICOS:

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

Ed-24 Agosto 2017

RESPECTO A ASPECTOS ÉTICOS:

Realizar las siguientes modificaciones al C.I.:

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

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



Dr. Eduardo Fernández G.
Presidente CEC



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

XII. ANEXO 2: Consentimiento informado participantes



Edición del CI 25/08/2017

Consentimiento Informado Para Participación en Proyecto de Investigación Dirigido a Adultos

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

Investigador Principal: Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez

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

Nombre del Participante:



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

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

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

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

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



Justificación de la investigación

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

Objetivo de la investigación

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

Beneficio de la investigación.

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

Tipo de intervención y Procedimiento.

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

Dependiendo del grupo al que haya sido asignado, se le solicitará hacer 1 de las siguientes acciones:

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

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

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

Riesgo de la investigación.

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

Criterios para selección de los participantes en el estudio

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

Edición del CI 25/08/2017

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 Pohhammer 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 INTERES.

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: _____

XII. ANEXO 3: Donación terceros molares



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

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

Investigador Principal: Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez

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

Nombre del Donante

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

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

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

XIV. ANEXO 4 : Protocolo de intervención probiótico sistémico

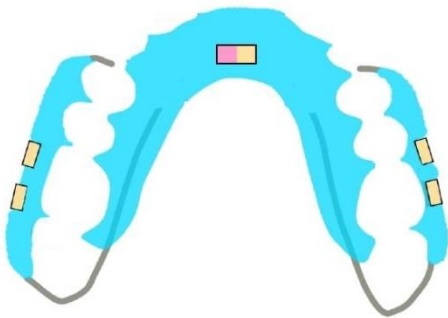


PROTOCOLO DE INTERVENCIÓN PROBIÓTICO SISTÉMICO

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

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

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



- **14 sobres de probiótico**
- **2 frascos pequeños (30 ml) con sacarosa**
- **1 frasco grande (150 ml) para probiótico**
- **Recipiente para guardar el dispositivo**

Al comienzo del periodo de experimentación, el cual le será indicado por el equipo de investigadores, Ud. deberá utilizar el dispositivo intraoral durante un **periodo continuo de 14 días, 24 horas al día**. **SÓLO** podrá remover el dispositivo desde el interior de la boca para higienizarse los dientes (cepillado), beber líquidos o comer. Esto significa que deberá dormir con el dispositivo por el tiempo que dure el estudio.

Al remover el dispositivo almacenarlo en recipiente que se le entregará para ello, envuelto en 1 cuadrado de toalla nova de 20x20 cm humedecida en agua.

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

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

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

- Enjuague bucal
- Antiácidos
- Medicamentos (por ejemplo: antibióticos o antisépticos)
- Consumo de alcohol
- Prohibido fumar cigarrillos y/o consumir drogas

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

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

Modo de Aplicación de las Soluciones:

Paso 0: DURANTE LOS 2 PRIMEROS DÍAS. Al levantarse por la mañana debe realizar la **primera aplicación de sacarosa** que se encuentra contenida en el frasco pequeño: una vez retirado el dispositivo de la boca, DEBE APLICAR 1 GOTTA DE SACAROSA EN CADA UNA DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO. Inmediatamente luego de aplicar la gota de sacarosa, debe volver a colocar el dispositivo dentro de la boca. **Aplicar sacarosa cada 2 horas, 8 veces al día.**

DESDE EL TERCER DÍA EN ADELANTE CONTINUAR CON PASO 1

Paso 1: Al levantarse por la mañana debe preparar la dosis de probiótico: tome 1 de los sobres, el cual contiene una porción de probióticos liofilizados y mézclela con 150 ml de agua potable en el frasco grande que se le ha entregado. Agite bien y conserve. DEBE GUARDAR ESTA PREPARACIÓN EN EL BOLSO PUES DEBERÁ INGERIRLA 2 HORAS DESPUÉS DE HABERLA REALIZADO.

Paso 2: Inmediatamente después de preparar el probiótico, debe realizar la **primera aplicación de sacarosa** que se encuentra contenida en el frasco pequeño: una vez retirado el dispositivo de la boca, DEBE APLICAR 1 GOTTA DE SACAROSA EN CADA UNA DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO. Inmediatamente luego de aplicar la gota de sacarosa, debe volver a colocar el dispositivo dentro de la boca.

Paso 3: 2 horas después de la primera aplicación de sacarosa, nuevamente debe **RETIRAR el dispositivo de la boca y proceder a INGERIR LA PREPARACIÓN REALIZADA AL COMIENZO DEL DÍA EN EL FRASCO PARA PROBIÓTICO** (frasco grande).

Paso 4: Luego de la ingestión del probiótico en el paso 3, enjuagar vigorosamente la boca con agua y aplicar inmediatamente 1 gota de sacarosa en todas las muestras. Luego de aplicar la gota de sacarosa, debe volver a colocar el dispositivo dentro de la boca.

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

XVI. ANEXO 6: Evaluación de cumplimiento final

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

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

Escala	Significado	
1	No cumplí con ninguna de las aplicaciones ni horarios	
2	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	

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.

XVII. ANEXO 7: Ficha clínica



Evaluación de voluntarios para participación en trabajo de investigación titulado **“EFECTO DEL PROBIÓTICO *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* EN FORMATO SISTÉMICO SOBRE LA DENSIDAD MINERAL, DUREZA SUPERFICIAL Y MORFOLOGÍA SUPERFICIAL DE ESMALTE DENTAL INSERTO EN UN MODELO *IN SITU* DE CARIES”**

Nombre				Rut	
Fecha de Nacimiento		Edad		Teléfono	

Anamnesis

1. Antecedentes mórbidos:
2. Antecedentes quirúrgicos (Fecha, diagnóstico, procedimiento, complicaciones):
3. Alergias:
4. Medicamentos (Nombre, dosis, fecha inicio)
5. Hábitos:
 - Tabaco:
 - Alcohol:
 - Drogas:
 - Controles odontológicos (frecuencia, fecha último control y causa):

6. Alimentación:

- Frecuencia:
- Ocasión:
- N° ingestas HC:
- Calidad:
- Consistencia:
- Valor potencial cariogénico:

7. Higiene Oral:

- Frecuencia de cepillado:
- Ocasión:
- Tipo de cepillo, pasta, enjuague

8. Antecedentes Familiares:

Examen Físico

1. Examen Físico General:

2. Examen Intraoral:

Alteraciones Salivales: (1) Si (2) No

Portador de prótesis removible u ortodoncia: (1) Si (2) No

3. Examen Periodontal Básico:

4. COPD

- C:
- O:
- P: