



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

**“Efecto del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 de
manera tópica, en la progresión de lesiones de caries de
esmalte, en un modelo *in situ*”**

Javier Alonso Naveillan Paulsen

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

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Rodrigo Cabello Ibacache

TUTORES ASOCIADOS

Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez

Dr. Mario Díaz Dosque

**Adscrito a Proyecto FIOUCH 17/015
Santiago-Chile 2020**



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA RESTAURADORA
ÁREA DE CARIOLOGÍA

**“Efecto del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 de
manera tópica, en la progresión de lesiones de caries de
esmalte, en un modelo *in situ*”**

Javier Alonso Naveillan Paulsen

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

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Rodrigo Cabello Ibacache

TUTORES ASOCIADOS

Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez

Dr. Mario Díaz Dosque

Adscrito a Proyecto FIOUCH 17/015
Santiago-Chile 2020

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Rosario Paulsen Martínez, a quien le debo las gracias infinitas por hacer todo posible, incluso ante la adversidad. Gran parte de mis logros te los debo a ti y a tu esfuerzo, te amo infinitamente y muchas gracias por el amor gigante que me das día a día.

A mis hermanos; Maximiliano e Isadora, quienes en momentos de flaqueza aportaron con oídos, palabras de aliento y alegría, y acompañaron mis años universitarios siempre pendientes de mis necesidades. Mi familia es el pilar de cada triunfo y cada gran paso, por ellos es todo.

A mi tía querida, María Inés Naveillan, que lamentablemente ya no está con nosotros, pero sus consejos de vida y enseñanzas siguen en pie. Jamás olvidaré la conversación que tuvimos que me ayudó a sobrepasar un momento difícil.

A Daniel Olivares, por ser mi gran amigo y apañe durante mis largos años de estadía universitaria, y por llevarme a tomar una de las mejores decisiones de la vida.

A mis amigos y amigas de Bachillerato; Francisca Muñoz, Gian Conti, Franco Miquio, Valentina Mosocoso, Abril Beltran, Catalina Serradilla y Matías Leiva. Por los 9 años de amistad que llevamos y donde hemos compartido infinitas experiencias juntos. Gracias por el apañe y las risas.

A mis amigos implacables Nicolás Maldonado y Alvaro hurtado, gracias a quienes los últimos años y sobre todo la clínica, se hicieron mucho más amenos.

Al Dr. Johanny Seguel, por ayudarme a escribir esta tesis y ser una fuente de inspiración, además de un gran amigo.

Al Dr. Rodrigo Cabello y la Dra. Daniela Tobar, por ayudarme en la realización de ésta tesis. Y todos aquellos, docentes y compañeros que me han ayudado en mi larga vida universitaria, a todos y todas muchas gracias.

A la familia Castrillón Silva; María Loreto, José Luis y Rocío. Gracias por todo el apoyo y el cariño durante estos últimos casi 6 años.

Y por último, a Fernanda Castrillón Silva, por ser mi gran apoyo y ejemplo a seguir, por ser la contención que muchas veces necesité y por todo el amor entregado durante casi toda mi estadía en la facultad. Estaré eternamente agradecido por todo.

El presente trabajo de investigación fue realizado con la colaboración de la estudiante de Magister en Ciencias Odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile; Dra. Daniela Susana Tobar Almache, y los alumnos de pregrado de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile; Sophya Consuelo Muñoz Ruiz y Joaquín Eduardo Aliaga ortega, bajo la tutela del profesor guía, Dr. Rodrigo Cabello Ibacache. Dentro de los resultados del mismo, existen datos que son compartidos con los trabajos de investigación titulados: “Efecto del probiótico *Lacticasebacillus rhamnosus* GG en la progresión de caries en un modelo *in situ*”; “Efecto en la progresión de lesiones de caries en esmalte en un modelo *in situ*, mediante el uso de probióticos de manera sistémica” y “Efecto del uso del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 de forma tópica y sistémica, en la progresión en lesiones de caries de esmalte en un modelo *in situ* en la cavidad oral” pertenecientes a los alumnos anteriormente mencionados, respectivamente. La información comprendida en éste y los demás trabajos de investigación, corresponde al resultado del trabajo colaborativo, dentro de una línea de investigación convergente, y por lo tanto, compartida como información necesaria y relevante para el desarrollo de ésta y las demás investigaciones.

ÍNDICE

I Resumen		1
II Marco teórico		3
2.1: Introducción		3
2.2: Caries dental con enfoque ecológico		4
2.3: El esmalte dentario		6
2.4: Proceso de desmineralización y remineralización		7
2.5: Probióticos		
8		
2.6: Modelo <i>in situ</i> de caries		10
2.7: Planteamiento del problema		11
III Hipótesis		13
IV Objetivo general		13
V Objetivos específicos		13
VI Materiales y método		14
6.1 Tipo de estudio y Estrategia Experimental		14
6.2 Muestra		14
6.3 Consideraciones éticas		16
6.4 Preparación de los cortes		17
6.5 Preparación de los aparatos		17
6.6 Desarrollo estandarizado de lesiones de caries		18
6.7 Modelo experimental e Intervención		18
6.8 Medición densidad mineral- Micro- CT		20
6.9 Medición de micro dureza superficial		21

	VII
6.10 Plan de análisis de datos	22
VII Resultados	23
7.1 Densidad mineral	24
7.2 Microdureza de vickers	27
VIII Discusión	27
IX Conclusión	35
X Referencias bibliográficas	36
XI Anexos	44

I. RESUMEN

La caries es una enfermedad que en la actualidad continúa siendo un problema de salud para Chile y el mundo. Pese a los esfuerzos de la comunidad científica por conocer más sobre la etiología, curso de la enfermedad, y el desarrollo tanto de tratamientos como métodos preventivos, ésta sigue estando dentro de las enfermedades más prevalentes del mundo. Entre las investigaciones realizadas en el campo de la cariología que buscan nuevos tipos de tratamientos o métodos preventivos de la caries dental, se encuentra evidencia que apunta en dirección a los probióticos; microorganismos que han sido ampliamente estudiados debido a sus efectos benéficos sobre la salud general y que han demostrado tener un efecto también en la cavidad oral, interactuando con el microbioma, contribuyendo al equilibrio microbiano. El objetivo de este estudio fue determinar los efectos en la progresión de lesiones de caries en esmalte en un modelo *in situ*, en pacientes sometidos a la acción tópica del probiótico *L. rhamnosus* SP1. Cuatro participantes sanos, sin lesiones de caries ni enfermedad periodontal fueron portadores de un dispositivo intraoral acrílico, ubicado en la arcada maxilar, con 10 plataformas en las que se insertaron bloques de esmalte humano a los que previamente se les midió la densidad mineral mediante Micro-Ct. En una primera fase de experimentación en la que se buscó generar lesiones de caries artificiales utilizando un modelo *in situ*, los 4 participantes divididos de forma equitativa en grupo experimental y grupo control, debieron portar el dispositivo intraoral durante 14 días e instilar 1 gota de sacarosa al 20% cada 2 horas, 8 veces al día en cada uno de los bloques de esmalte como desafío cariogénico. Una vez concluidos los 14 días las muestras fueron recolectadas y medida su densidad mineral mediante Micro-Ct, posteriormente fueron nuevamente aleatorizadas y distribuidas en los dispositivos intraorales. En la segunda fase de experimentación, los dos participantes del grupo experimental utilizaron el dispositivo intraoral durante 14 días manteniendo el desafío cariogénico llevado cabo en la primera fase, e instilaron una solución de probiótico a la cual se le suspendió una dosis de *Lactobacillus rhamnosus* Sp1, junto a la segunda instilación de sacarosa. El grupo control realizó la misma intervención que el grupo experimental, vale decir, mantuvieron el desafío cariogénico por 14 días pero sin

instilar la solución de probiótico. Finalmente se determinó nuevamente la densidad mineral de las muestras y se midió la Microdureza del esmalte. Los resultados indicaron que, los promedios de microdureza presentaron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre ambos grupos de estudio, los valores más altos fueron obtenidos por los bloques de esmalte expuestos a sacarosa y probiótico ($260,92 \pm 25$ para el grupo sacarosa /probiótico; $180,59 \pm 59,66$ para el grupo control). La densidad mineral inicial promedio de las muestras fue de $2,90 \pm 0,13 \text{ gr/cm}^3$ para el grupo experimental y $2,81 \pm 0,05 \text{ gr/cm}^3$ el grupo control. En los resultados de densidad mineral luego de la primera fase, se observó una disminución en la densidad mineral promedio de las muestras para el grupo experimental ($2,34 \pm 0,10 \text{ gr/cm}^3$) y para el grupo control ($2,38 \pm 0,13 \text{ gr/cm}^3$). En la segunda fase se observó una diferencia significativa en la mediana de las muestras expuestas a sacarosa y probiótico ($2,17 \pm 0,11 \text{ gr/cm}^3$) por sobre las muestras expuestas únicamente a sacarosa ($2,04 \pm 0,14 \text{ gr/cm}^3$). Los resultados sugieren que la aplicación tópica del probiótico *Lactobacillus rhamnosus Sp1* en esmalte con una lesión de caries, podría tener un efecto atenuante en la tasa de progresión de la lesión.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Introducción

La caries es una de las enfermedades crónicas más prevalente en la población alrededor del mundo (Selwitz y cols., 2007), afectando a las personas desde los primeros años de vida, pues estudios indican que aproximadamente el 50% de los niños y niñas de la población mundial padecen caries (Drinking, 2009).

En Chile, la prevalencia de caries comienza a manifestarse a temprana edad, por ejemplo, en niños de 2 años ésta es de 16,8% y puede llegar a extenderse a más del 99% en las personas mayores de 65 años (Ministerio de Salud, 2011). Si la caries no se trata a tiempo, puede afectar aspectos tales como la sonrisa, el habla, la oclusión, funcionalidad, hasta el desarrollo psicosocial de los pacientes, alterando así la calidad de vida de las personas (Mathur y Dhillon, 2018). Entre las principales afecciones de esta patología se destaca la odontalgia y una mayor susceptibilidad en la pérdida de dientes (Goettems y cols., 2001; Gerritsen y cols., 2010). Es por esto que las enfermedades orales en general son consideradas un importante problema de salud pública (Sheiham, 2005).

La caries dental se desarrolla donde existen depósitos microbianos organizados en una microbiota que no son removidas o alteradas con frecuencia por desgaste mecánico, produciéndose una desmineralización de los tejidos dentarios por efecto de las variaciones de pH (Fejerskov, 2008).

El esmalte dentario se encuentra en un constante proceso de desmineralización y remineralización producto del intercambio de iones con el medio (Fejerskov, 2008). El proceso de desmineralización y remineralización es un proceso de equilibrio dinámico, con períodos de alternancia entre captación y pérdida de minerales estructurales. La desmineralización puede revertirse en sus primeras etapas a través de la inclusión de calcio, fosfato y fluoruro, pero a menudo no es un proceso autolimitado, y sin el cuidado apropiado, la lesión puede progresar hasta el compromiso pulpar del diente (Selwitz y cols., 2007). Por lo mismo, existen diversos métodos para prevenir el desarrollo de lesiones de caries y mantener un cuidado diario de la integridad dentaria. Entre ellos, el uso diario de pasta dental con flúor se

considera dentro de los motivos por los que la caries ha disminuido en todo el mundo en las últimas décadas (Pitts y cols., 2017) y ha sido considerado un método preventivo para las personas con bajo riesgo (Wong y cols., 2017), sin embargo, este método por sí sólo no ha sido suficiente para el control de la caries (Cannon y cols., 2019).

Ante la necesidad de nuevas alternativas que surjan como un complemento a los métodos actuales, los investigadores han apostado por un grupo de microorganismos llamados probióticos que, dentro de sus propiedades han demostrado tener efectos dentro de la cavidad oral (Seminario, 2017; Piwat y cols., 2020).

2.2 Caries dental con enfoque ecológico

En la cavidad oral existen microorganismos (microbioma) que conviven de manera simbiótica con el hospedero, sin embargo, esta relación es susceptible a romperse debido a cambios en el microambiente oral. La composición del microbioma oral es característica de esta zona, pues el medioambiente juega un rol clave para determinar qué grupo de microorganismos pueden colonizar, crecer y formar parte de la microbiota. El crecimiento de estas colonias es un reflejo de los determinantes ecológicos presentes en cada sitio, dependiendo de la cantidad de oxígeno, nivel de pH y suministro de nutrientes. Una vez que un consorcio microbiológico se establece en un sitio, la composición general de esta microbiota puede permanecer estable en el tiempo (Marsh, 2018).

La microbiota existe en la boca como biopelículas formadas por diferentes especies, cuya composición y actividad metabólica están determinadas por los factores del hospedero y del medio ambiente (Filoche y cols., 2010). Las biopelículas se desarrollan a través de una adición sucesiva de bacterias en las que la diversidad y riqueza de la microbiota aumenta con el tiempo (Jakubovics y Kolebrander, 2010). Las primeras bacterias colonizadoras modifican el medio ambiente, permitiendo que las especies más exigentes se adhieran y posteriormente se establezcan. A medida que la biopelícula madura, algunas de las bacterias sintetizan polímeros extracelulares a partir de sacarosa, y estos contribuyen a la formación de la matriz

de la biopelícula (Koo y cols., 2013). Esta matriz tiene funciones importantes para la estructura, prevenir la desecación y retener productos extracelulares (Flemming y Wingender, 2010). La matriz contiene ADN extracelular, derivado de bacterias secretoras y bacterias lisadas, contribuyendo a la estructura física de las biopelículas dentales (Jakubovics y cols., 2010). Por lo tanto, las biopelículas microbianas están organizadas estructural y funcionalmente, existiendo como comunidades microbianas altamente interactivas (Welch y cols., 2016). Estas interacciones microbianas pueden ser tanto sinérgicas como antagónicas y crear una serie de interdependencias que brindan estabilidad y resistencia al cambio (Jakubovics, 2015), también permiten a los consorcios de organismos catabolizar sustratos del hospedero estructuralmente complejos, y del mismo modo, las bacterias anaerobias prosperan en un hábitat abiertamente aeróbico coexistiendo con especies que consumen oxígeno (Bradshaw y cols., 1998). De esta manera, las comunidades microbianas orales exhiben propiedades emergentes, ya que los atributos de la comunidad son más que la suma de las especies individuales (Konopka, 2009). En resumen, las biopelículas dentales son naturales y juegan un papel positivo en el mantenimiento de la salud bucal, y muchas de las bacterias residentes brindan importantes beneficios. Existe una red compleja de interdependencias entre los miembros de la biopelícula, que contribuyen a mantener la estabilidad de la comunidad y la resistencia al cambio (Marsh, 2018).

La caries se produce cuando se altera la relación simbiótica entre hospedero y microbiota. Estudios realizados con personas de diferentes edades y países, han demostrado que existen diferencias en la composición de la microbiota presente en las lesiones de caries, con un enriquecimiento de especies de fenotipo acidogénico y tolerante a los ácidos (Marsh, 2018). Si bien los primeros estudios basados en cultivos habían demostrado que la caries del esmalte se asociaba con aumentos en el número y las proporciones de *Streptococcus mutans* (Loesche, 1986), estudios posteriores demostraron que esto no era del todo cierto (Svensater y cols., 2003; Simon, 2007; Conrads y cols., 2014). La cariogenicidad de las bacterias implicadas con la caries dental se ha relacionado con su capacidad para convertir rápidamente los azúcares en ácidos reduciendo el pH y desmineralizando la superficie para poder

seguir creciendo y metabolizando los azúcares bajo estas condiciones (Harper y Loesche, 1984). Muchas de las bacterias residentes beneficiosas requieren un pH neutro y no pueden proliferar en condiciones ácidas. Si tales condiciones de pH bajo se repiten regularmente, las especies acidógenas / acidúricas eventualmente pueden aumentar sus proporciones y reducir aún más el pH del medioambiente, superando en cantidad a las especies beneficiosas (Bradshaw y cols., 2002).

2.3 El esmalte dentario

El esmalte dental es uno de los componentes del diente junto a la dentina, la pulpa y el cemento radicular. Corresponde a la estructura más mineralizada en el cuerpo de los vertebrados y es formado a partir de una matriz extracelular única derivada de la síntesis y secreción de proteínas por las células ameloblásticas del epitelio interno del esmalte. El esmalte dental maduro está adaptado para absorber las tensiones mecánicas y abrasivas esenciales a lo largo de la vida útil del organismo (Fincham y cols., 1999). Gracias a su ubicación más externa, elevada dureza y alta resistencia a la fractura, permite la protección de la dentina y la pulpa ante daños externos (Rivera y cols., 2012). Se compone aproximadamente por un 96% de mineral, principalmente Hidroxiapatita (HA) carbonatada, mientras que el restante 4% está conformado por agua (3%) y proteínas (1%) (Bajaj y Arola, 2009).

La porción mineral está fundamentalmente conformada por ejes de HA de tamaño nanométrico (~25 nm de espesor y ~100 nm de ancho) que se combinan sistemáticamente para formar estructuras alargadas, similar a fibras de unos 4-8 mm de diámetro llamadas prismas, que se extienden desde la unión amelodentinaria hasta la superficie oclusal (Ten Cate, 1998). Los prismas se encuentran unidos por una capa delgada ($\ll 1$ mm) de material orgánico basado en proteína (Rivera y cols., 2012).

Dentro de las propiedades mecánicas del esmalte, el módulo de elasticidad se encuentra en un rango entre 70 y 120 gigapascales (GPa), la dureza varía entre 3 y 6 GPa, la tenacidad a la fractura reportada para el esmalte dental varía entre 0,4 y 1,5 megapascales (MPa) y la densidad mineral promedio es de 2,95 g/cm³ (Rivera y cols., 2012).

2.4 Proceso de desmineralización y remineralización

En la superficie del esmalte existe un delicado equilibrio de desmineralización y remineralización. La desmineralización corresponde a la pérdida de minerales, principalmente calcio y fosfato estructural de la hidroxiapatita durante la exposición a un ambiente ácido (Subramaniam y Telegeti, 2016) mientras que la remineralización dental es el proceso de llevar minerales del ambiente circundante (es decir, saliva, microbioma) a estructuras dentales parcialmente desmineralizadas, puede reemplazar minerales en esmalte y dentina parcialmente desmineralizados o crear precipitados minerales amorfos en los espacios entre cristales. Este proceso puede ocurrir naturalmente o ser inducido por terapias. La caries dental entonces, es un proceso dinámico que involucra periodos de alternancia de desmineralización y remineralización (Subramaniam y Telegeti, 2016).

Los principales factores que intervienen en este proceso involucran a un hospedero, higiene bucal, saliva, dientes, microbiota, sustrato y el tiempo (Núñez y Bacallao, 2010).

Una disbiosis entre el hospedero y el microbioma genera un ambiente propicio para el desarrollo de bacterias acidogénicas, por consiguiente, se favorece la capacidad de disminución en el pH medioambiental (Marsh, 2018). El principal ácido involucrado en la desmineralización es el ácido láctico, que provoca el descenso del pH hasta un punto en que el equilibrio se desplaza hacia la desmineralización generando una subsaturación. Como consecuencia de la pérdida de mineral se produce una mayor porosidad en la superficie del esmalte, ampliación de los espacios entre los cristales y una disminución en la dureza de la superficie (Zero, 1999).

Una vez que los azúcares se eliminan de la boca gracias a la deglución y la dilución salival, los ácidos producidos por la microbiota pueden ser neutralizados a causa de la acción amortiguadora de la saliva, lo que provoca que el pH de la saliva tienda a neutralizarse aumentando la saturación de iones calcio, fosfato y fluoruro,

revirtiendo la desmineralización y favoreciendo la remineralización (Lussi y cols., 2004).

Para la detención de la progresión de las lesiones de caries el objetivo es desplazar el equilibrio dinámico hacia la remineralización de los tejidos, para lo cual es importante recuperar la relación simbiótica entre hospedero y microbiota.

2.5 Probióticos

Los probióticos son definidos como “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedero” (OMS, 2006).

Tradicionalmente los probióticos han sido utilizados para la prevención de enfermedades del tracto gastrointestinal, mayoritariamente bacterias del género *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp., sin embargo, en las últimas décadas ha habido un creciente interés por estudiar los efectos en la cavidad oral de estos microorganismos, principalmente para combatir enfermedades mediadas por la microbiota (Hasslöf y cols., 2013). Es más, la suplementación con probióticos ha sido recomendada como una de las estrategias preventivas para la caries, y se proponen intervenciones para contribuir a mantener una simbiosis microbiana favorable y restaurar la homeostasis microbiana oral (Pawat y cols., 2020).

Especies de *Lactobacillus* de los cuales son considerados probióticos, son las cepas que incluyen a: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri* y *L. reuteri*. Las cepas de *Bifidobacterium* incluyen *B. bifidum*, *B. longum* y *B. infantis* (Ahola y cols., 2002).

Aunque sus mecanismos de acción siguen sin estar del todo claros, los probióticos pueden afectar directamente varias interacciones microbianas, como adhesión, co-agregación, inhibición del crecimiento y producción de bacteriocinas, además de modular indirectamente la respuesta inmune del hospedero (Pawat y cols., 2020). Investigaciones *in vitro* han sugerido un gran potencial de los probióticos de los grupos *Lactobacilli* y *Bifidobacteria*, para modular la ecología microbiana de las

biopelículas, especialmente aquellas que se desarrollan a nivel oral, intestinal, vaginal y de heridas (Lebeer y cols., 2011).

Para considerar que un probiótico pueda tener efectos en la cavidad oral es necesario evaluar su capacidad de adherirse y colonizar superficies. Aunque la cavidad oral no es considerada como el hábitat natural de algunos probióticos, sí se han encontrado cepas de *Lactobacillus* en la cavidad oral, tales como; *L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* y *L. fermentum*, siendo este último el más prevalente (Colloca y cols., 2000; Köll y cols., 2008). Estos hallazgos indican que las especies del género *Lactobacillus*, como miembros de la microbiota oral residente, podrían incidir en el equilibrio microecológico de la cavidad oral; ya sea reduciendo el número de bacterias cariogénicas, su habilidad para coagregarse con las cepas asociadas a la caries y la capacidad de reducir la formación de biopelículas (Caglar y cols., 2009; Lang y cols., 2010).

Si bien los efectos benéficos de los probióticos a nivel sistémico son conocidos, pocos estudios han utilizado indicadores propios de las enfermedades orales, como el incremento en el desarrollo de nuevas lesiones de caries, profundidad al sondaje o pérdida de inserción clínica, esto con el objetivo de promover la eficacia de los probióticos al prevenir o tratar la caries o enfermedad periodontal (Gruner y cols., 2016). También hay estudios que señalan que los probióticos no tienen tales efectos positivos e incluso pueden ser potencialmente perjudiciales (Gruner y cols., 2016).

A pesar de las contradicciones halladas en la literatura, actualmente se sigue investigando con estos microorganismos. En el año 2001 una investigación que estudió el efecto de las bacterias probióticas en el riesgo y desarrollo de lesiones de caries en niños preescolares mediante el consumo de leche suplementada con *L. rhamnosus* GG, demostró efectos beneficiosos sobre los factores de riesgo de caries (Nase y cols., 2001) y desde entonces el interés por esta especie ha aumentado con los años demostrando tener buenos resultados en caries dental y enfermedad periodontal (Sandoval y cols., 2021), destacando entre ellos su uso para prevenir y reducir el riesgo de desarrollar nuevas lesiones de caries en niños y adultos (Sivamaruthi y cols., 2020) o el efecto benéfico que produce la ingesta

regular de leche suplementada con *L. rhamnosus* SP1 (cepa isógena respecto a la cepa GG) en la incidencia de nuevas lesiones de caries (Rodríguez y cols., 2016).

El año 2019 se logró determinar que biosurfactantes producidos por *L. rhamnosus* GG, pueden modificar el nivel de expresión de los genes de virulencia, y reducir capacidades adhesivas de bacterias presentes en la cavidad oral, además de interferir con la comunicación célula-célula y el desarrollo de biopelículas, sugiriendo que este probiótico puede ser utilizado para intervenir el desarrollo de una microbiota acidogénica y, por consiguiente, alterar el desarrollo o la progresión de las lesiones de caries (Tahmourespur y cols., 2019).

Recientemente la literatura ofrece evidencia de que ciertas cepas probióticas tienen la capacidad no solo de prevenir lesiones de caries, sino también revertir el proceso de lesiones de caries. Piwat y cols. (2020) demostraron que tras el consumo de leche fortificada con *Lactobacillus paracasei* SD1, luego de 6 y 12 meses en niños y niñas de edad preescolar, se produjo una reversión importante de lesiones de caries en las superficies de dientes de estos, en un régimen de consumo diario y tres veces por semana (Piwat y cols., 2020).

En la actualidad, los vehículos más comunes para la administración de los probióticos son los productos lácteos, además de tabletas, cápsulas, pastillas y gotas, todas ellas por ser productos de fácil consumo, sin embargo, no se ha establecido una dosis óptima para el cuidado oral (Hasslöf y Stecksén-Blicks, 2019).

2.6 Modelo *in situ* de caries

Los modelos de caries *in situ* implican el uso de aparatos u otros dispositivos intraorales que crean condiciones definidas que simulan el proceso de caries dental. Son considerados el modelo de estudio intermedio, entre la situación clínica natural no controlada (estudios clínicos) y la situación de laboratorio altamente controlada (*in vitro*). Gracias a su diseño experimental más flexible, es posible incluir varios de los factores que involucran la naturaleza de la caries, como son el substrato dentario, microbiota, desafío cariogénico y tiempo (Zero, 1995).

Una característica de este tipo de modelos es que utiliza un número relativamente bajo de sujetos, lo que podría convertirse en una desventaja desde el punto de vista de la representatividad, además de depender de su adherencia al tratamiento. Sin embargo, a diferencia de un ensayo clínico, requiere de mucho menos tiempo de experimentación, simulando lo que ocurre en el proceso natural del desarrollo de lesiones de caries sin comprometer la salud oral del hospedero (Zero, 1995).

Desde su invención en los años sesenta, los modelos de estudio *in situ* han sido útiles para estudiar múltiples factores relacionados a la enfermedad de caries, como el mecanismo de acción de fluoruros (Koulourdes y cols., 1982), la acción de alimentos sobre la caries dental (Giacaman y cols., 2013), o la acción de agentes preventivos (Schlafer y cols., 2017).

Para lograr un alto valor predictivo y relevancia clínica, se debe procurar obtener el mayor número de condiciones naturales, sin embargo, el investigador debe mantener el control de las variables para detectar resultados científicamente válidos en un número limitado de pacientes (Zero, 1995). Se ha establecido que los parámetros para lograr un adecuado control de las variables corresponden a: diseño físico, características de los participantes, tejido a utilizar, diseño del estudio y método de evaluación (Curzon y Hefferren, 2001; Zero, 1995).

2.7 Planteamiento del problema

Ante la necesidad de modificar la forma de abordar la enfermedad de caries debido a las preocupantes cifras que se tenían a principios del siglo XXI, en Chile a partir del año 2011, con la Reforma de Salud y la puesta en marcha de las estrategias para el logro de las metas de salud bucal para la década 2011-2020 (Ministerio de Salud, 2011), se establecieron objetivos basados en la disminución de la prevalencia de la caries con énfasis en la promoción y prevención en salud oral, misma línea de acción que plantea el Plan Nacional de Salud Bucal 2018-2030 (Ministerio de Salud, 2017) estrategia para enfrentar de forma más eficiente y menos costosa los tratamiento que cubre el sector público.

En un contexto en el que la caries continúa siendo un problema de salud pública, la investigación se dirige en la búsqueda de alternativas que complementen a los

actuales tratamientos basados en Flúor. Una interesante alternativa involucra productos que utilicen probióticos como potenciales agentes terapéuticos, debido al amplio abanico de posibilidades que ofrecen en cuanto a su administración y uso masivo entre la población, principalmente en preescolares, sumado a que de acuerdo a los antecedentes presentes en la literatura, los probióticos son útiles para prevenir y revertir lesiones de caries (Tahmourespur y cols., 2019; Piwat y cols., 2020).

Por lo mencionado anteriormente, el siguiente trabajo de investigación propone averiguar cuál es el efecto en la progresión de lesiones de caries de esmalte, en pacientes que utilicen el probiótico *L. rhamnosus* SP1 de manera tópica, mediante un modelo de lesiones de caries *in situ*.

III. HIPÓTESIS

Existe una disminución en la tasa de progresión de lesiones de caries en esmalte en un modelo *in situ*, en pacientes que utilizan el probiótico *L. rhamnosus* SP1 de manera tópica.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar efectos en la progresión de lesiones de caries en esmalte en un modelo *in situ* en pacientes sometidos a la acción tópica del probiótico *L. rhamnosus* SP1.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la progresión de lesiones de caries de esmalte en un modelo *in situ*, en individuos que utilizan el probiótico *L. rhamnosus* SP1 de manera tópica.
2. Evaluar la progresión de lesiones de caries de esmalte en un modelo *in situ* en individuos que no utilizan el probiótico *L. rhamnosus* SP1.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Tipo de estudio y Estrategia Experimental

Se llevó a cabo un estudio aplicando un modelo experimental *in situ*, consistente en sujetos voluntarios que portaron un aparato removible durante un total de 28 días, que sirvió de plataforma para montar 10 bloques de esmalte humano indemne. Los primeros 14 días el objetivo fue generar lesiones de caries estandarizadas en los bloques de esmalte de acuerdo a un modelo previamente establecido (Colil, 2019), a partir de una solución de sacarosa que fue entregada a los pacientes. Los siguientes 14 días se dio una solución que contenía el probiótico *L. rhamnosus* SP1 y se expuso los bloques de esmalte a ésta solución. Finalmente, se evaluó el efecto tópico del probiótico en la tasa de progresión de las lesiones de caries en esmalte.

6.2 Muestra

La población portadora de los aparatos correspondió a personas voluntarias de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

La muestra total consistió en 40 láminas de esmalte obtenidas a partir de terceros molares provenientes de sujetos sanos, que fueron sometidos a cirugías de exodoncia de terceros molares incluidos (que no tuvieron contacto directo con la cavidad oral), donados por el Instituto Nacional de Ortodoncia (Santiago, Chile). Para el cálculo del tamaño de muestra, se decidió según la experiencia de trabajos anteriores (Azán, 2019; Colil, 2019 Seguel, 2020) y de acuerdo a la cantidad de mediciones necesarias para la determinación de microdureza superficial. Se consideró un riesgo alfa de 0,05 y un riesgo beta de 0,2 en un contraste bilateral. Se asumió una desviación estándar común de 15,3 (Colil, 2019), con una tasa de pérdidas de seguimiento del 5%, y un poder estadístico de 80%. Se precisaron un total de 40 unidades de observación las cuales fueron divididas equitativamente para asignar 20 bloques de esmalte a cada grupo de estudio (grupo control y grupo experimental) para detectar una diferencia igual o superior a 15 unidades de microdureza Vickers. El número de unidades de observación fue determinado en

base a estudios previos con resultados positivos utilizando un tamaño muestral similar (Colil, 2019) y al programa en línea Granmo.

Las muestras se dividieron en dos grupos en la fase experimental:

- Grupo A experimental: 20 muestras de esmalte que fueron divididas equitativamente en 2 sujetos voluntarios portadores del aparato deacrílico, las cuales fueron sometidas mediante instilación a una solución de sacarosa y luego al efecto tópico de una solución con el probiótico *L. rhamnosus* SP1.
- Grupo B control: 20 muestras de esmalte que fueron divididas equitativamente en 2 sujetos voluntarios portadores del aparato deacrílico, las cuales fueron sometidas mediante instilación a una solución de sacarosa.

Criterios de selección de los voluntarios:

a) Criterios de inclusión:

1. Cantidad mínima de 22 dientes
2. Pacientes ASA 1
3. Edad: entre 18-35 años
4. COPD < 8

b) Criterios de exclusión:

1. Hiposialia
2. Edéntulos
3. Fumadores
4. Mujeres Embarazadas
5. Portadores de aparatos intraorales
6. Enfermedad Periodontal
7. Lesiones cariosas activas o inactivas
8. Uso de antibióticos o antisépticos bucales menos de 3 meses antes de la intervención

Cada voluntario fue evaluado y registrado según una ficha clínica establecida (Anexo 1).

6.3 Consideraciones éticas

La norma establece acorde a la ley 20.584, en el párrafo 7º de la protección de la autonomía de las personas que participan en una investigación científica, artículo 21, donde se señala que *“Toda persona deberá ser informada y tendrá derecho a elegir su incorporación en cualquier tipo de investigación científica biomédica, en los términos de la ley N°20.120. Su expresión de voluntad deberá ser previa, expresa, libre, informada, personal y constar por escrito. En ningún caso esta decisión podrá significar menoscabo en su atención ni menos sanción alguna”*. En cumplimiento de lo antes descrito, se contó con un consentimiento informado (Anexo 2) el cual fue entregado y explicado al paciente en una charla donde además se le instruyó sobre su salud oral y el uso del dispositivo, además, si él o la paciente quisieran desistir, podría hacerlo en cualquier momento del experimento. A su vez, según el artículo 22 de la misma ley se señala que *“Mediante un reglamento expedido por el Ministerio de Salud, en los términos de la ley N°20.120, se establecerán las normas necesarias para regular los requisitos de los protocolos de investigación y los procedimientos administrativos y normas sobre constitución, funcionamiento y financiamiento de comités para la evaluación ético-científica; para la aprobación de protocolos y para la acreditación de los comités por parte de la Autoridad Sanitaria; la declaración y efectos sobre conflictos de interés de investigadores, autoridades y miembros de comités y, en general, las demás normas necesarias para la adecuada protección de los derechos de las personas respecto de la investigación científica biomédica”*. Es por ello que el protocolo de estudio fue presentado ante el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y al Comité Institucional de Bioseguridad (Anexo 3). Es importante destacar que este tipo de estudio tiene la ventaja de no poner en riesgo la salud oral de los pacientes, ya que el objeto de estudio no corresponde al esmalte dentario de los voluntarios. Además, la naturaleza del estudio a corto plazo ayudó a superar problemas éticos asociados a ensayos que involucran seres humanos expuestos a una situación determinada dentro de un período (Zero, 1995).

6.4 Preparación de los cortes

Se utilizaron terceros molares incluidos sin contacto con el medio oral donados voluntariamente por participantes del Instituto Nacional de Ortodoncia con indicación de extracción, para lo cual se entregó un consentimiento informado para la obtención de dichos molares (Anexo 4). Estos se mantuvieron en solución de Timol al 0,2%, pH 7, por menos de dos meses (Cury y cols., 1997).

Los terceros molares fueron montados en acrílico, cortados con una sierra de diamante de baja velocidad (SYJ-150, MTI) y su forma final fue dada con un disco de acero diamantado de 0,20 mm de grosor marca (Horico, Alemania) montado en pieza de mano. De los bloques de esmalte obtenidos se cortaron 40 unidades de 3x3x3 mm, los cuales posteriormente fueron sometidos a autoclave a vapor por 20 min a 120°C, para asegurar su esterilidad (Muñoz, 2019).

Una vez obtenidos los bloques de esmalte y previo a la formación de lesión de caries, se les determinó la densidad mineral mediante Micro-CT (*explicado en el ítem 6.8*).

6.5 Preparación de los aparatos

El diseño consistió en un dispositivo intraoral removible maxilar confeccionado en acrílico de termo polimerización, con 4 plataformas ubicadas en la zona vestibular de molares superiores, 5 plataformas en la zona palatina de los molares superiores, y una superficie en la región anterior del paladar.

El modelo para su fabricación fue realizado a partir de una impresión maxilar de alginato con cubeta de stock y técnica convencional, cuyo vaciado fue realizado en yeso piedra inmediatamente posterior al retiro de boca.

La confección fue realizada en un laboratorio con instrucciones específicas; el dispositivo debería contar con 4 ranuras de 4x4x4 mm ubicadas en la zona vestibular de molares, 6 ranuras de 4x4x4 mm por palatino: 4 en la zona de molares, 1 en zona de premolares y 1 ranura en la zona media palatina.

Los bloques de esmalte fueron montados individualmente de forma aleatoria en cada ranura utilizando cera adhesiva de alta fusión.

Los bloques fueron numerados del 1 al 10 desde la zona más posterior derecha vestibular a la zona más posterior derecha palatina, de izquierda a derecha por vestibular y de izquierda a derecha por palatino, siendo nominada la muestra media palatina como la número 7 (figura 1).

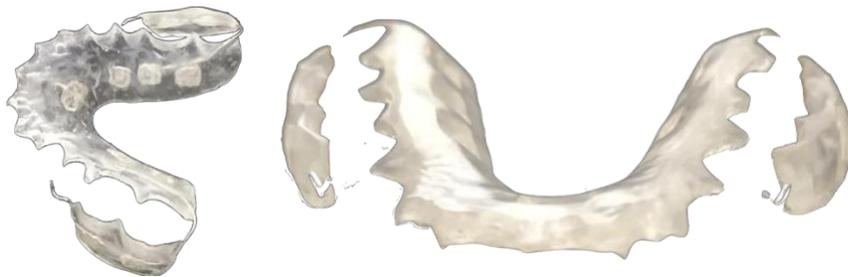


Figura 1: Dispositivo intraoral

6.6 Desarrollo estandarizado de lesiones de caries

Los voluntarios debieron utilizar un dispositivo intraoral portando las muestras de esmalte durante 14 días, 24 horas al día, exceptuando momentos de alimentación e higiene oral. En ese período a cada una de las muestras se le debió aplicar una gota de sacarosa al 20% como desafío cariogénico, cada 2 horas hasta lograr 8 aplicaciones diarias (Cury y cols., 1997). La aplicación debió realizarse con un gotario fuera de boca, tras lo cual el voluntario debió esperar 5 minutos para volver a introducir el dispositivo (Colil, 2020).

6.7 Modelo experimental e Intervención

El experimento *in situ* consistió en la medición de la progresión de lesiones de caries al usar el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 de forma tópica.

Para la selección de los participantes se realizó una anamnesis exhaustiva, debiendo cumplir con los criterios de inclusión para poder ser parte del experimento.

El total de participantes que se requirió fueron 4; 2 para el grupo de estudio experimental y 2 para el grupo control.

Una vez confeccionados los dispositivos intraorales y probados, se realizó una inducción explicando la intervención a realizar, donde se entregó la información respectiva (Anexo 5), y un consentimiento informado que debió ser firmado una vez finalizada la inducción (Anexo 2).

El desarrollo de la intervención constituyó dos fases:

Fase 1, generación de lesiones de caries: en una primera instancia cada voluntario debió usar el aparato con los 10 bloques de esmalte. Los 4 voluntarios debieron utilizar los aparatos día y noche, solo retirándolo de la boca durante los momentos de higiene oral, alimentación y aplicación de la solución de sacarosa según el protocolo descrito. A cada una de las muestras se les aplicó una gota de sacarosa al 20% (Aires y cols., 2006), como desafío cariogénico, cada 2 horas hasta lograr 8 aplicaciones diarias durante 14 días (Cury y cols., 1997). La aplicación fue realizada mediante un gotario fuera de boca, tras lo cual se debía esperar 5 minutos para volver a introducir el dispositivo. Durante esta etapa se produjo la pérdida de 1 muestra correspondiente al grupo que luego usaría el probiótico.

Posterior a los 14 días, se recopilaron todos los bloques de esmalte para hacer las mediciones de contenido mineral. Se utilizó el equipo SKYSCAN1272 de Bruker® usando el software SkyScan Data Viewer, CTan y CTvox3D para visualizar los cortes y las reconstrucciones en tres dimensiones de los bloques de esmalte para ver el contenido mineral. Luego de 5 días, una vez estandarizadas las muestras fueron reincorporadas a los dispositivos intraorales y devueltos a los voluntarios para continuar con la fase experimental. En esta fase no se realizaron mediciones de microdureza debido al deterioro superficial que sufrirían las muestras, por lo que se decidió realizar posterior a la fase 2 (*explicado en el ítem 6.9*).

Fase 2, fase experimental: Se produjo la exposición al probiótico. Se mantuvo el desafío cariogénico. El grupo experimental debió instilar una gota en cada bloque a partir de una solución de probiótico a base de 150 mL de agua a la cual se le

suspendió una dosis de *Lactobacillus rhamnosus* 10^8 UFC/mL, una vez al día junto con la segunda instilación de sacarosa, mientras que el grupo control debió mantener el desafío cariogénico, es decir, agregar una gota de sacarosa cada 2 horas en un total de 8 aplicaciones diarias durante 14 días. Un bloque de esmalte perteneciente al grupo experimental fue perdido durante esta fase del experimento.

Una vez terminados los 14 días de fase experimental, las muestras fueron recolectadas y analizadas para determinar densidad mineral y microdureza superficial.

6.8 Medición densidad mineral- Micro- CT

Se utilizó el sistema de Micro-CT Sky Scan versión de software 1.0.5 (Bruker Corporation, Estados Unidos) para evaluar los cambios en la densidad mineral (g/cm^3) de las muestras, posterior a su exposición en el modelo de caries *in situ*. Cada bloque de esmalte fue montado individualmente y en la misma posición utilizando un procedimiento estándar, procurando que el haz de rayos X incidiese perpendicularmente a la superficie. El escaneo fue realizado por un operador experto en técnicas de imagen de Micro-CT de la Plataforma experimental Bio-CT, perteneciente a la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (FONDEQUIP EQM150010).

Las secciones de imágenes digitales fueron obtenidas con las siguientes condiciones de irradiación: voltaje de 50 kV, una fuente de corriente de 1005 μA y 1 mm de filtro de aluminio (Esquivel-Upshaw y cols., 2020). Cada muestra se montó individualmente, todos en la misma posición, procurando que el haz de rayos x incidiera perpendicularmente a la superficie. Durante el proceso de escaneo las muestras rotaron 360° en incrementos angulares de 0,25, el cual generará 1400 proyecciones (Schwass y cols., 2009).

Las imágenes obtenidas de los cortes dentales fueron reconstruidas a través del software NRecon versión 1.7.4.2 de Sky Scan y evaluadas de manera cualitativa por un examinador utilizando los softwares SkyScan Data Viewer y CTvox. La evaluación cuantitativa de la densidad mineral fue realizada usando el programa

CTan (version 1.13.5.1, SkyScan; Bruker), en el que se separó de manera tridimensional la superficie externa del esmalte del aire en la superficie exterior y otros tejidos a través de la función de región y aplicación de una lista de tareas.

6.9 Medición de microdureza superficial

Posterior al periodo experimental se realizó la medición de micro dureza superficial a 39 muestras de esmalte, con el microindentador de Vickers Struers Duramin (USA) proporcionado por el Laboratorio de Ciencias de los Materiales de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas (Figura 2). A los bloques de esmalte se les penetró con una carga de 200 g (1,961 N) durante 20 segundos realizando 3 indentaciones por ejemplar, obteniendo un tamaño muestral N: 19 para el grupo experimental y N: 20 para el grupo control. Las indentaciones se distribuyeron de manera aleatoria (Figura 3). A cada uno de los grupos se le calculó el promedio de las 3 mediciones obtenidas por cada muestra.



Figura 2: Microindentador de Vickers Struers Duramin (USA).

Los valores de microdureza 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 (mm) (Majithia y cols., 2016).

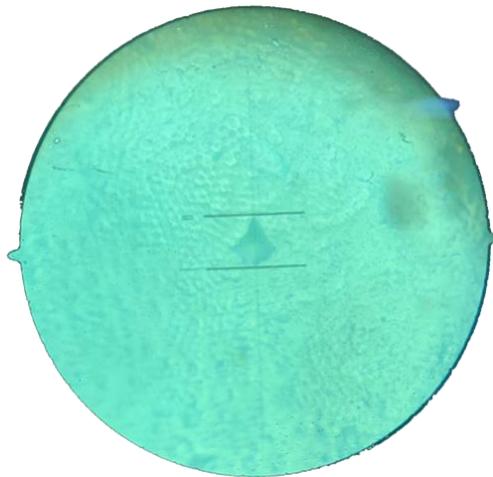


Figura 3: Medición realizada en muestra de esmalte observada a través del microindentador de vickers. Se observa marca característica para realizar la medición, en una zona aleatoria de la superficie de esmalte.

6.10 Plan de análisis de datos

Los datos fueron codificados e ingresados a una base de datos en archivo Excel Office para Windows. Luego se realizó una prueba de distribución de los datos para evaluar la normalidad. Para el análisis estadístico se utilizaron los estadísticos correspondientes de acuerdo a la distribución y características de los datos. Se realizó un análisis descriptivo de los datos de microdureza y densidad mineral de las 39 muestras totales, agrupadas en los dos grupos experimental y control. Se realizó una comparación de datos entre los grupos de muestras probiótico/sacarosa y sólo sacarosa, teniendo como valores referenciales de magnitud los obtenidos a partir de las muestras luego de ser expuestas a un protocolo previo realizado por el

equipo de investigación. A continuación, se presenta un esquema que resume los pasos del experimento (Figura 4):

Fase 1

Preparación de los chips de esmalte Confección de aparatos intraorales Desarrollo de lesiones de caries



Fase 2

Aleatorización de las muestras

Medición de microdureza de vickers con microindentador y densidad mineral con Micro-Ct

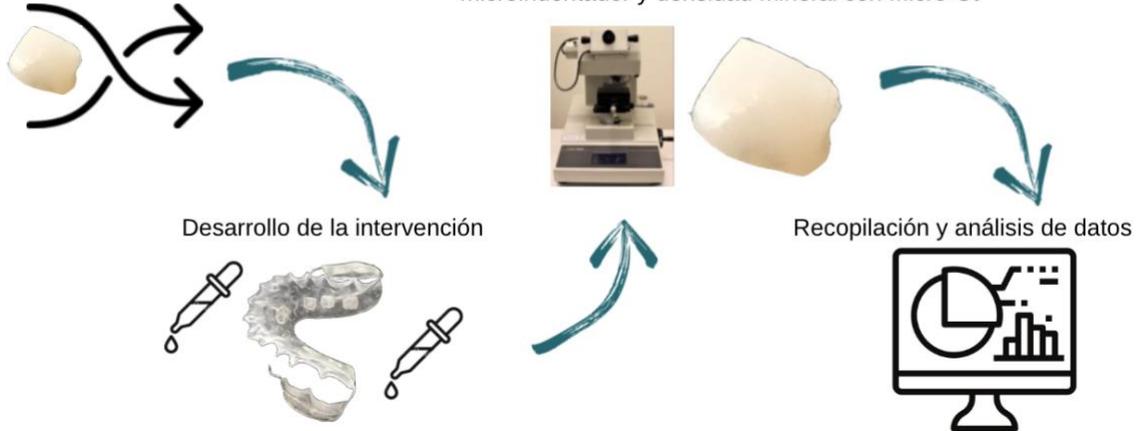


Figura 4: Esquema resumen de modelo experimental

VII. RESULTADOS

De los 4 voluntarios reclutados para el estudio, la totalidad completó el procedimiento. Hubo pérdida de 1 muestra (bloque de esmalte). Las muestras fueron recuperadas luego de cada fase de experimentación, fueron testeadas y aleatorizadas para posteriormente ser ubicadas en cada dispositivo hasta la fase final, donde fueron recolectadas y separadas según el grupo experimental; grupo control con muestras expuestas a sacarosa, y muestras experimentales expuestas

a sacarosa y probiótico *L. rhamnosus* SP1. Las muestras fueron removidas de su respectivo dispositivo luego de la fase final y testeadas mediante Micro-CT y Microdureza de Vickers. Los voluntarios fueron supervisados durante los días de uso del aparato y se realizó una evaluación del cumplimiento del protocolo luego de cada fase del experimento (Anexos 6 y 7).

7.1 Densidad mineral

Previo a la fase de formación de lesiones, los bloques de esmalte fueron escaneados por microtomografía computarizada (Micro-CT) para cuantificar la densidad mineral, posteriormente fueron instalados en los dispositivos intraorales y entregados a los voluntarios para la fase de formación de lesiones de caries. Las muestras fueron nuevamente recolectadas y escaneadas por el Micro-CT para cuantificar la densidad mineral, posterior a la exposición de los bloques de esmalte a sacarosa, para ser aleatorizadas e instaladas nuevamente en los dispositivos intraorales para ser usados por los voluntarios. Finalmente, se recolectaron las muestras y se dividieron según el grupo de estudio (probiótico/sacarosa y sólo sacarosa) para ser escaneadas por Micro-CT obteniendo imágenes que nos permitieron visualizar la superficie de las muestras (Figura 5), según el grupo de estudio (control o experimental). Para un análisis cuantitativo, 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 de estudio (control o experimental).

A continuación se exponen los resultados del estudio de densidad mineral de las muestras, antes de la formación de lesión de caries, después de la formación de lesión de caries y finalmente, después de la exposición tópica al probiótico manteniendo el desafío cariogénico (Tablas N°1, N°2 y N°3, respectivamente). También se expone una comparación gráfica de los resultados entre los dos grupos de estudio (control y experimental), para cada una de las etapas del experimento descritas anteriormente (Figura 6).

Tabla N°1. Análisis descriptivo, valores de densidad mineral BMD1 por Micro-CT antes de la primera fase de estudio (antes de la formación de lesión de caries artificial).

Grupo de estudio	Media inicial BMD1 (g/cm³)	Desviación estándar	n
Probiótico	2,90	0,13	20
Control	2,81	0,05	20

Análisis de comparación de 2 grupos de estudio, se realizó con T-Student, considerando la distribución normal de los datos. Las diferencias no son significativas.

Tabla N°2. Análisis descriptivo, valores de densidad mineral (BMD2) por Micro-CT luego de la primera fase de estudio (formación de lesión de caries artificial).

Grupo de estudio	Media inicial BMD2 (g/cm³)	Desviación estándar	n
Probiótico	2,34	0,10	19
Control	2,38	0,13	20

Análisis de comparación de 2 grupos de estudio se realizó con T-Student, considerando la distribución normal de los datos. Las diferencias no son significativas.

Tabla N°3. Análisis descriptivo, valores de densidad mineral (BMD3) por Micro-CT luego de la segunda fase de estudio (aplicación de probiótico más sacarosa o solo sacarosa)

Grupo de estudio	Mediana BMD3 (g/cm³)	Desviación estándar	n
Probiótico	2,17*	0,11	19
Control	2,04*	0,14	20

Análisis de comparación de 2 grupos de estudio se realizó con Wilcoxon rank-sum test, considerando la distribución anormal de los datos. Se muestran las diferencias significativas luego de realizar el análisis de comparación de los dos grupos *p<0,05.

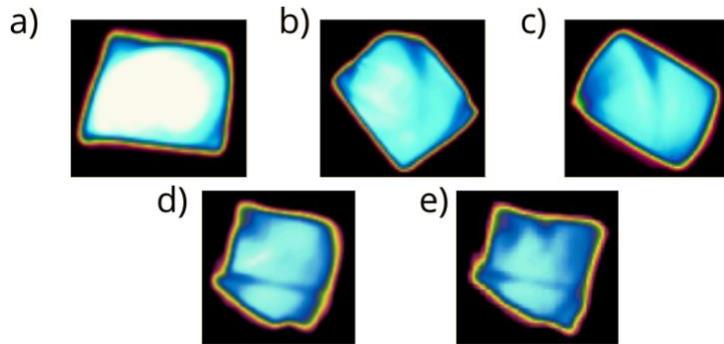


Figura 5: Imágenes obtenidas mediante Micro-CT en el Software Ctan.A (voltaje de 50 kv y fuente de corriente de 1005 uA). a) BMD1 del bloque de esmalte sano. b) BMD2 después de la formación de lesión de caries artificial (grupo probiótico). c) BMD3 después de la exposición a probiótico + sacarosa. d) BMD2 después de la formación de lesión de caries artificial (grupo control). e) BMD3 del bloque de esmalte control expuesto solo a sacarosa (grupo control). Las imágenes muestran la cantidad y distribución de mineral presente en la superficie analizada, representada por tonalidades azules. A medida que la superficie presenta una menor densidad mineral, el tono azulado se hace más oscuro.

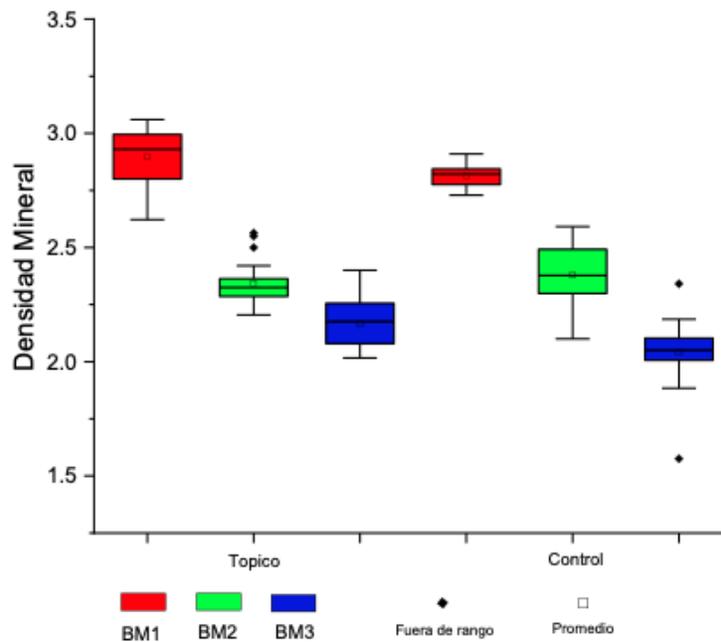


Figura 6: Valores de densidad mineral BMD1, BMD2 y BMD3 de las muestras en cada fase de experimentación, para los bloques de esmalte según grupo de estudio.

7.2 Microdureza Superficial de Vickers

La dureza superficial de los bloques de esmalte se determinó utilizando un indentador de diamante Vickers en un probador de microdureza estándar. Como se mencionó anteriormente, se decidió realizar esta medición luego de finalizar la segunda fase, para evitar daños y alteraciones en la superficie de esmalte de las muestras antes de la exposición al probiótico. Los resultados de microdureza se presentan en la Tabla N°4. Se observan los promedios y las desviaciones estándar de los valores para el grupo de muestras control y el grupo tratado con probiótico *L. rhamnosus* SP1. Los valores promedios difieren entre los 2 grupos de muestras.

Al analizar y comparar los promedios para cada grupo de muestras, se observa una diferencia significativa en la media de microdureza superficial entre el grupo de muestra control y el grupo de muestras expuesto a sacarosa / probiótico *L. rhamnosus* SP1 ($P < 0,05$).

Tabla N°4. Análisis descriptivo, valores de la microdureza superficial obtenida (MDS) en durómetro, posterior a la segunda fase del estudio (probiótico y sacarosa / sacarosa).

Grupo de estudio	Media MDS (HV)	Desviación estándar	n
Control	180,59*	59,66	20
Probiótico	260,96*	25,34	19

Análisis de comparación de 2 grupos de estudio, se realizó con Wilcoxon rank-sum test, considerando la distribución anormal de los datos. Se muestran las diferencias significativas luego de realizar el análisis de comparación de los dos grupos * $p < 0,05$.

VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo de investigación se expuso a un grupo de voluntarios y voluntarias al uso del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 durante 14 días utilizando un formato de aplicación tópica en un modelo *in situ*. Las muestras de esmalte dispuestas en un dispositivo intraoral fueron analizadas en 3 instancias para evaluar su densidad mineral; previo a la formación de lesiones de caries, posterior a la formación de lesiones de caries y posterior a la administración del probiótico bajo

un desafío cariogénico. En esta última se evaluó también la microdureza superficial, con la finalidad de evaluar con estas variables los efectos del uso tópico del mencionado probiótico. Durante la primera fase experimental se extravió una muestra correspondiente al 2,5% del tamaño muestral total, lo que es inferior al 5% establecido como margen, por lo que los resultados no se ven alterados por este acontecimiento.

Para medir la variación cuantitativa y cualitativa de la cantidad de mineral presente en las muestras se utilizó la técnica de Micro-CT. Dentro de las ventajas del uso de esta técnica es que permite determinar la densidad mineral y los cambios estructurales de la lesión sin necesidad de seccionamiento o preparación de la muestra (Shahmoradi y cols., 2017). De acuerdo a los resultados del estudio, obtenidos en cada fase donde se utilizó la técnica de Micro-CT, se evidenció que ambos grupos tanto experimental como control, comenzaron con una densidad mineral media similar; 2,90 y 2,81 g/cm³, respectivamente, valores anteriormente reportados por otros autores como Dowker (2003) o Cochrane (2012), los cuales obtuvieron valores en el rango de 2,57- 3,15 gr/cm³ para tejido sano. Tal resultado era esperable ya que las muestras obtenidas provenían de terceros molares incluidos que no estuvieron en contacto con la cavidad oral de los donantes.

Luego de la primera fase, una vez inducida la lesión producto del desafío cariogénico, es interesante observar cómo la densidad mineral media del grupo control y grupo experimental (2,38 g/cm³ y 2,34 g/cm³, respectivamente) descendió a un nivel similar, coincidiendo con los valores obtenidos por Dowker (2003) y Azán (2019) los cuales son 2.1-2.7 g/cm³, evidenciando no sólo que efectivamente se produjo una lesión en las muestras de esmalte, sino que ambos grupos presentaron lesiones de características prácticamente iguales, lo que permitió comenzar la segunda fase experimental con muestras que fueron perfectamente aleatorizables, y que contaron con una lesión de caries estándar que proporcionó la posibilidad de comparar a futuro los efectos de la aplicación tópica del probiótico, en la densidad mineral de un tejido ya dañado. Un aspecto importante a destacar, es que no existen hasta la fecha estudios que hayan realizado observaciones a partir de lesiones de

caries estándar utilizando un modelo de estudio *in situ*, siendo éste un estudio único al momento de escribir la presente tesis, abriendo la posibilidad de utilizar esta metodología en futuras investigaciones que requieran partir de tejido desmineralizado y no de tejido sano.

Los resultados de la exposición de las muestras al efecto tópico del probiótico *L. rhamnosus* SP1 indicaron una menor desmineralización (0,17 g/cm³) que el grupo control (0,34 g/cm³), apreciable cuantitativamente como cualitativamente, ya que, de acuerdo al resultado de las imágenes de la figura 5, el color azul más oscuro, indicativo de desmineralización, está más presente en la imagen de BMD3 correspondiente a las muestras del control. Considerando que ambos grupos continuaron con el mismo desafío cariogénico, los resultados sugieren que el uso de *L. rhamnosus* SP1 de manera tópica, si bien no detiene el proceso de formación de lesión de caries, tiene un efecto atenuante, disminuyendo la cantidad de mineral perdido en el mismo período de tiempo que el grupo control, corroborando los hallazgos de estudios anteriores (Piwat, 2020).

La medición de microdureza superficial del esmalte constituye también, un método objetivo e importante para evaluar la desmineralización de la estructura dentaria y por lo tanto, como indicador de presencia de lesión de caries (Featherstone y cols., 1987; Gutiérrez y Reyes, 2001). Los resultados de microdureza de la superficie del esmalte demuestran que el tratamiento tópico con *L. rhamnosus* SP1 proporciona una mayor resistencia al tejido dentario ante el proceso de desmineralización propio de la caries, ya que, al evaluar ambos grupos expuestos al desafío cariogénico, el grupo expuesto solo a sacarosa presentó una microdureza superficial inferior, y por lo tanto más desmineralizado que el grupo expuesto a sacarosa/probiótico.

Los valores de microdureza superficial en esmalte sano, expuestos en la literatura, son de 320 a 400 unidades de Vickers (Craig, 1958; Ryge y cols., 1961). Los valores de microdureza de las muestras expuestas solo a sacarosa (179 ± 59,65) son similares a los valores descritos en estudios previos que utilizaron el mismo método de formación de lesiones de caries *in situ* (Azán, 2019, Colil, 2019), pero distintos a estudios que utilizaron un método de formación de lesión de caries *in vitro*, como

los valores publicados por Zamorano y cols. (2015) y Subashree y cols. (2019). A pesar de las diferencias, independiente del método utilizado para la formación de lesiones de caries, la literatura sugiere que con valores inferiores a 300 unidades de Vickers, la desmineralización del esmalte ya es considerada como lesión de caries.

Al momento de escribir este trabajo, no fue posible encontrar estudios que, utilizando un modelo de caries *in situ*, haya evaluado la microdureza de Vickers posterior a la formación de una lesión de caries y posterior al uso de alguna cepa de probiótico. No obstante, en el estudio publicado por Elgamily y Safwat (2019), en el que probaron pastas dentales remineralizantes con diferentes componentes, entre ellos el probiótico *L. rhamnosus*, la microdureza de Vickers en el grupo que utilizó el probiótico resultó mayor que las muestras que no fueron expuestas al probiótico luego de 7 días de tratamiento, pasando de tener una microdureza previa de $63,9 \pm 19,7$ luego de una desmineralización *in vitro*, a una microdureza de $117,4 \pm 12,9$. Si bien los valores difieren de los de nuestro trabajo luego de la desmineralización ($180,59 \pm 59,66$) y exposición al probiótico ($260,96 \pm 25,34$), es interesante observar cómo la presencia del probiótico *L. rhamnosus* se encuentra directamente relacionada con una mejoría comparativa en cuanto a microdureza de Vickers se refiere.

Para estudios de este tipo, un modelo *in situ* constituye una ventaja comparado con ensayos clínicos aleatorizados debido a la gran cantidad de voluntarios que estudios de este tipo requieren, además del largo período de tiempo que es necesario para obtener los resultados. A su vez, las condiciones más flexibles de un modelo *in situ* permiten incluir varios de los factores que involucran la naturaleza de la caries en comparación a las estrictas condiciones de un modelo *in vitro* (Zero, 1995). A pesar de las bondades del modelo, en su implementación hay múltiples variables experimentales a considerar, es por esto, que el cumplimiento de los protocolos definidos al inicio del proceso experimental son necesarios para llevar a cabo el estudio de manera óptima (Sung y cols., 2014). Tal característica dependiente de la rigurosidad del propio voluntario podría ser considerada una debilidad del modelo *in situ*, ya que requiere de constante vigilancia por parte de los investigadores e

involucra aspectos como la incomodidad del uso del aparato y la posibilidad de abandono del estudio por motivos ajenos a quien realiza la investigación, lo que podría comprometer los plazos estipulados. Para efectos de este estudio, la elección tanto del número de bloques de esmalte, duración y número 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* (Higham, 2005; Arruda, 2012). Sin embargo, un aspecto a mejorar dentro de la actual investigación refiere a la posibilidad de pérdida de las propias muestras dentro del dispositivo intraoral, ya sea por extravío o por daños ocurridos durante los períodos de análisis afectando el tamaño de la muestra. Por lo tanto, para llevar a cabo de buena manera un estudio con un modelo *in situ*, es necesario mantener siempre una buena comunicación con cada uno de los involucrados.

La efectividad de los probióticos en la prevención y tratamiento de enfermedades de la cavidad oral ha sido respaldada en la literatura por diferentes estudios en los últimos años (Nase y cols., 2001; Hasslöf, 2013; Rodríguez y cols., 2016; Piwat y cols., 2020; Sivamaruthi y cols., 2020; Sandoval y cols., 2021). Para el caso de la caries, existen ensayos clínicos que han demostrado los efectos de los probióticos en diferentes situaciones, utilizando por ejemplo, *Lactobacillus rhamnosus* GG en niños de 1 a 6 años, observando una disminución en el riesgo de caries. El probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 también ha sido probado en estudios anteriores, entre los que destaca el estudio realizado por Rodríguez y cols. (2016), los cuales realizaron una intervención en niños de 2-3 años socialmente vulnerables, en el que se observó una disminución en el desarrollo de caries cavitadas en el grupo tratado con probiótico.

Si bien la evidencia demuestra una tendencia a confirmar la efectividad de los probióticos para prevenir o tratar enfermedades de la cavidad oral, según el trabajo realizado por Gruner y cols. (2016), hasta ese año no había evidencia suficiente para recomendar el uso de probióticos para el tratamiento de la caries, no así para el manejo de periodontitis y gingivitis. La necesidad de encontrar más evidencia que respalde el uso de los probióticos para mejorar la salud oral, ha llevado a los

investigadores a profundizar en la observación acerca del uso de probióticos, diversificando también los modelos de estudio realizados para así continuar obteniendo evidencia suficiente. En consecuencia con lo anterior, es posible afirmar que en la literatura existen pocos estudios que hayan reportado haber utilizado un modelo *in situ* de caries para probar el efecto de probióticos (Lodi, 2015; Azán, 2019; Colil, 2019). Lodi (2015), realizó un estudio con un modelo *in situ* de caries en el que 10 voluntarios fueron expuestos a leches suplementadas con probióticos, utilizando *L. casei*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* SPP., y *L. paracasei* dentro de los grupos de observación. La aplicación del probiótico, al igual que el presente estudio, fue de administración tópica fuera de boca por 5 minutos. La prueba de microdureza superficial también demostró diferencias estadísticamente significativas entre las muestras expuestas a sacarosa y las expuestas a *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* SPP., y *L. paracasei* (presentes en la misma leche suplementada), en donde este último grupo promedió valores más altos que el grupo expuesto a sacarosa. Los valores de microdureza de la investigación de Lodi, también son similares a los valores obtenidos por la actual investigación. Cabe señalar que tanto el vehículo como las cepas utilizados en dicho estudio fueron distintos a los empleados en este trabajo de investigación.

Los estudios previos realizados por Colil (2019), Azán (2019), y Seguel (2020), utilizando el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 en un modelo *in situ* de caries obtuvieron en todos los casos, resultados similares a los nuestros para el análisis de microdureza y densidad mineral, pero la gran diferencia entre aquellos estudios y éste es que las pruebas fueron realizadas a partir de tejido sano, mientras que nosotros administramos el probiótico en tejido previamente dañado utilizando un modelo de generación de lesión de caries estándar, lo que permite responder de manera específica a la pregunta de investigación planteada en este trabajo.

A pesar de los buenos resultados obtenidos en anteriores estudios, la selección de las mejores cepas probióticas para el tratamiento o uso preventivo de la caries sigue siendo un problema vigente. La elección de la cepa que se utilizó en este estudio se basa en la evidencia científica previamente descrita, la cual obtuvo resultados

prometedores (Rodríguez y cols., 2016; Azán, 2019; Colil, 2019; Seguel, 2020) , pero se desconoce si efectivamente corresponde a la cepa más eficiente para el manejo de lesiones de caries. En el año 2012, Bosh y cols. realizaron un estudio *in vitro* donde se analizaron ciertos atributos de cepas de probióticos, como reducida producción de ácido, riesgo de cariogenicidad, potencial de resistencia a los antibióticos y parámetros generales de toxicidad, pero no se ha establecido un consenso que permita establecer con claridad qué cepa tiene el mayor potencial para establecer un equilibrio favorable para la salud oral, ni tampoco se conoce cuál es el vehículo ideal para su administración.

La dificultad para identificar una cepa probiótica óptima para su uso con fines terapéuticos y/o preventivos en relación a la caries, radica en que aún se desconoce el mecanismo, o los mecanismos de acción precisos mediante los cuales se producen sus efectos en la cavidad oral, aunque existen aproximaciones, pues se ha descrito en la literatura que los probióticos tienen la capacidad de modular la respuesta inflamatoria (humoral y celular), producir sustancias como el peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, y competir con patógenos por superficies de adhesión y nutrientes (Seminario y cols., 2017), sin embargo, el estudio no describe una cepa en particular. Para ser más precisos, existe un estudio donde se utilizó *Lactobacillus rhamnosus* ATCC7469 para inhibir la formación de biopelículas, y se demostró que se producían biosurfactantes con la capacidad de modificar el nivel de expresión de los genes de virulencia y reducir sus capacidades adhesivas, además de interferir con el desarrollo de biopelículas y la comunicación de célula a célula (Tahmourespour y cols., 2019). Sin embargo, aún se requiere mayor evidencia que demuestre el mecanismo de acción de los probióticos en relación a la cavidad oral, por lo que más estudios de este tipo son necesarios para conocer de mejor manera aspectos como la vía de administración óptima o la dosis adecuada.

La evidencia indica que existen fundamentos importantes para considerar a los probióticos como una alternativa para prevenir y tratar la caries. Al igual que en este estudio, hasta la fecha se han utilizado indicadores objetivos como la microdureza superficial o densidad mineral para evaluar el esmalte dentario expuesto a

condiciones cariogénicas, con el uso de probiótico bajo múltiples vías de administración, y ya sea por vía tópica o sistémica se ha visto un efecto concordante con los resultados de investigaciones anteriores. También se han estudiado diferentes metodologías y modelos de estudio, siendo el modelo *in situ* el que más se acerca a las condiciones de la cavidad oral, y se ha probado con diferentes cepas probióticas que han demostrado tener un efecto en enfermedades orales.

El presente estudio ha contribuido a ser una prueba única, hasta el momento de escribir esta tesis, que el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1, administrado de manera tópica, tiene un efecto positivo cuando ya existe una lesión de caries, logrando un ralentizamiento del progreso de estas mismas y prolongando el tiempo requerido para formar una cavidad en el esmalte.

IX. CONCLUSIÓN

El probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 administrado en forma tópica, tiene un efecto benéfico/atenuante, en la tasa de progresión de desmineralización del esmalte dental, en el proceso de formación de lesión de caries.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahola A, Yli-Knuuttila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlström A, Meurman J, Korpela R (2002). Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Archives of Oral Biology*, 47(11), 799–804.

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

Azán P (2019). 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. Tesis para optar al título de Cirujano Dentista. Universidad de Chile. Santiago, Chile.

Bajaj D, & Arola D (2009). On the R-curve behavior of human tooth enamel. *Biomaterials*, 30(23–24), 4037–4046.

Bradshaw D, Marsh P, Hodgson R, Visser J (2002). Effects of glucose and fluoride on competition and metabolism within in vitro dental bacterial communities and biofilms. *Caries Research*, 36(2), 81–86.

Bradshaw D, Marsh P, Watson K, Allison C (1998). Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infection and Immunity*, 66(10), 4729–4732.

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.

Cannon M, Vorachek A, Le C, White K (2019). Retrospective review of oral probiotic therapy. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 43(6), 367–371.

Cochrane NJ, Anderson P, Davis G, Adams G, Stacey M, Reynolds E (2012). An x-ray microtomographic study of natural white-spot enamel lesions. *J Dent Res.* 2012;91(2):185-91.

Colloca M, Ahumada M, López M, Nader-Macías M (2000). Surface properties of lactobacilli isolated from healthy subjects. *Oral Diseases*, 6(4), 227–233.

Craig RG (1958). The microhardness of enamel and dentin. *J Dent Res* 1958;17:661-8.

Conrads G, de Soet JJ, Song L, Henne K, Sztajer H, Wagner-Döbler I, Zeng AP (2014). Comparing the cariogenic species *Streptococcus sobrinus* and *S. mutans* on whole genome level. *J Oral Microbiol*. Dec 3;6:26189.

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

Curzon M, & Hefferren J (2001). Modern methods for assessing the cariogenic and erosive potential of foods. *British dental journal*, 191(1), 41–46.

De Arruda A, dos Santos P, Sundfeld R, Berger S, Briso A (2012). Effect of hydrogen peroxide at 35% on the morphology of enamel and interference in the de-mineralization process: an in situ study. *Operative dentistry*, 37(5), 518–525

Dowker SE, Elliott JC, Davis GR, Wassif HS (2003). Longitudinal study of the threedimensional development of subsurface enamel lesions during in vitro demineralisation. *Caries Res*. 37:237-245.

Drinking R (2009). Surgeon General ' s Perspectives. *Public Health Reports*, 124(February), 2007–2009.

Elgamily H, Safwat E, Soliman Z, Salama H, El-Sayed H, Anwar M (2019). Antibacterial and Remineralization Efficacy of Casein Phosphopeptide, Glycomacropeptide Nanocomplex, and Probiotics in Experimental Toothpastes: An In Vitro Comparative Study. *Eur J Dent*. 2019 Jul;13(3):391-398.

Esquivel-Upshaw F, Shu-Min Hsu, Bohórquez A, Abdulhameed N, Scheiffele, Mijin Kim, Neal D, Chal J, Ren F (2020). Novel methodology for measuring intraoral wear in enamel and dental restorative materials. *Clinical and Experimental Dental Reserch*. 2020;6:677–685.

Fejerskov O. (2008). The disease and its diagnosis. Defining the disease: an introduction. In *Dental caries. The disease and its clinical management*.

Filoche S, Wong L, Sissons C (2010). Oral biofilms: Emerging concepts in microbial ecology. *Journal of Dental Research*, 89(1), 8–18.

Fincham A, Moradian-Oldak J, Simmer J (1999). The structural biology of the developing dental enamel matrix. *Journal of Structural Biology*, 126(3), 270–299.

Flemming H, & Wingender J (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633.

Gerritsen A, Allen P, Witter D, Bronkhorst E, Creugers N (2010). Tooth loss and oral health-related quality of life: A systematic review and meta-analysis. *Health and Quality of Life Outcomes*, 8, 1–11.

Giacaman RA, Miranda Reyes P, Bravo León V (2013). Caries risk assessment in Chilean adolescents and adults and its association with caries experience. *Braz Oral Res*. 2013 Jan-Feb;27(1):7-13.

Goettems M, Shqair A, Bergmann V, Cadermatori M, Correa M, Demarco F (2018). Oral health self-perception, dental caries, and pain: the role of dental fear underlying this association. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 28(3), 319–325.

Gruner D, Paris S, Schwendicke F (2016). Probiotics for managing caries and periodontitis: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Dentistry*, 48, 16–25. doi: 10.1016/j.jdent.2016.03.002

Gutiérrez M, & Reyes J (2001). Enamel hardness and caries susceptibility in human teeth. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 21(2), 36-40.

Harper D, & Loesche W (1984). Growth and acid tolerance of human dental plaque bacteria. *Archives of Oral Biology*, 29(10), 843–848.

Hasslöf P, West C, Videhult K, Brandelius C, Stecksén-Blicks C (2013). Early intervention with probiotic *Lactobacillus paracasei* F19 has no long-term effect on caries experience. *Caries Research*, 47(6), 559–565.

Hasslöf P & Stecksén-Blicks C (2019). Probiotic bacteria and dental caries. *Monographs in Oral Science*, 28, 99–107.

Higham S, Pretty I, Edgar W, Smith P (2005). The use of in situ models and QLF for the study of coronal caries. *Journal of dentistry*, 33(3), 235–241.

Jakubovics N & Kolenbrander P (2010). The road to ruin: The formation of disease-associated oral biofilms. *Oral Diseases*, 16(8), 729–739.

Jakubovics N, Nicholas S (2015). Intermicrobial Interactions as a Driver for Community Composition and Stratification of Oral Biofilms. *Journal of Molecular Biology*, 427(23), 3662–3675.

Köll P, Mändar R, Marcotte H, Leibur E, Mikelsaar M, Hammarström L (2008). Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(2), 139–147.

Koulourdes T (1982) Implication of remineralization in the treatment of dental caries in processing symposium on current topics in dental caries in commemoration of the decennial anniversary of Hihon university school of dentistry at Matsudo, Matsuda, Japan. 198.1982

Konopka A. (2009). What is microbial community ecology. *ISME Journal*, 3(11), 1223–1230.

Koo H, Falsetta M, Klein M (2013). The Exopolysaccharide Matrix: A Virulence Determinant of Cariogenic Biofilm. *Journal of Dental Research*, 92(12), 1065–1073.

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

Lang C, Böttner M, Holz C, Veen M, Ryser M, Reindl A, Pompejus M, Tanzer J (2010). Specific lactobacillus/mutans streptococcus Co-aggregation. *Journal of Dental Research*, 89(2), 175–179.

Lebeer S, Verhoeven T, Claes I, De Hertogh G, Vermeire S, Buyse J, Van Immerseel F, Vanderleyden J, De Keersmaecker S (2011). FISH analysis of Lactobacillus biofilms in the gastrointestinal tract of different hosts. *Letters in Applied Microbiology*, 52(3), 220–226.

Loesche W. (1986). Role of Streptococcus mutans in Human Dental Decay. *Microbiological Reviews*, 50(4), 353–380.

Lodi C, Oliveira S, Brighenti L, Delbem F, ELBEM, Martinhon ACB, Rodrigues CC. (2015). Effects of probiotic fermented milk on biofilms, oral microbiota, and enamel. *Brazilian Oral Research*. 29(1): 01-7.

Lussi A, Jaeggi T, Zero D (2004). The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Research*, 38(SUPPL. 1), 34–44.

Colil M. P (2019). Efecto Del Uso Tópico Del Probiótico Lactobacillus Rhamnosus Sp1 En Un Modelo De Caries in Situ. Tesis para optar al título de Cirujano Dentista. *Universidad De Chile*.

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

Mathur V & Dhillon J (2018). Dental Caries: A Disease Which Needs Attention. *Indian Journal of Pediatrics*, 85(3), 202–206.

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.

Ministerio de Salud (2017). Plan Nacional de Salud Bucal 2018-2030. *Departamento de Salud Bucal*, 80.

Ministerio de Salud (2011). Prevalencia y severidad de la Patología Bucal en Chile. *Meta*.

Muñoz F (2019). Modelo in situ de caries dental: Estudio piloto. Tesis para optar al

título de Cirujano Dentista. Universidad de Chile.

Nase L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Pönkä A, Poussa T, Korpela R, Meurman J (2001). Effect of Long-Term Consumption of a Probiotic Bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in Milk on Dental Caries and Caries Risk in Children. *Caries Research*, 35(6), 412–420.

Núñez D & Bacallao L, (2010). Bioquímica de la caries dental. *Revista Habanera de Ciencias Medicas*, 9(2), 156–166.

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.

Pitts N, Zero D, Marsh P, Ekstrand K, Weintraub J, Ramos-Gomez F, Tagami J, Twetman S, Tsakos G, Ismail A (2017). Dental caries. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(May).

Piwat S, Teanpaisan R, Manmontri C, Wattanarat O, Pahumunto N, Makeudom A, Krisanaprakornkit S, Nirunsittirat A (2020). Efficacy of Probiotic Milk for Caries Regression in Preschool Children: A Multicenter Randomized Controlled Trial. *Caries Research*, 54(5–6), 491–501.

Ryge G, Foley D, Fairhurst C (1961). Micro-indentation Hardness. *J Dent Res*. 1961;40: 1116-26.

Rivera C, Ossa V, Arola D (2012). Revista ingeniería Biomédica Revista Ingeniería Biomédica Fragilidad y comportamiento mecánico del esmalte dental. *Revista Ingeniería Biomedica*, 6, Volumen 6, número 12, julio-diciembre 2012,.

Rodríguez G, Ruiz B, Faleiros S, Vistoso A, Marró M, Sánchez J, Urzúa I, Cabello R (2016). Probiotic compared with standard milk for high-caries children. *Journal of Dental Research*, 95(4), 402–407.

Sandoval F, Faleiros S, Cabello R, Díaz-Dosque M, Rodríguez G, Escobar A (2021).

The consumption of milk supplemented with probiotics decreases the occurrence of caries and the salivary concentration of hβD-3 in children. *Clinical Oral Investigations*.

Schwassa D, Swaina M, Purtona D, Leichter J (2009). A System of Calibrating Microtomography for Use in Caries Research. 2009 S. Karger AG, Basel.

Schlafer S, Meyer R, Dige I, Regina V (2017). Extracellular DNA Contributes to Dental Biofilm Stability. *Caries research*, 51(4), 436–442.

Selwitz R, Ismail A, Pitts N (2007). Dental caries. *Lancet*, 369(9555), 51–59.

Seminario M, López J, Estrugo A, Ayuso R, Jané E (2017). Probiotics and oral health: A systematic review. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 22(3), e282–e288.

Sheiham A (2005). Oral health, general health and quality of life. *Bulletin of the World Health Organization*, 83(9), 644.

Simon L (2007). The role of *Streptococcus mutans* and oral ecology in the formation of dental caries.

Sivamaruthi B, Kesika P, Chaiyasut C (2020). A Review of the Role of Probiotic Supplementation in Dental Caries. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(4), 1300–1309.

Seguel J (2020). Efecto del uso tópico/sistémico del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en la densidad mineral, microdureza superficial y morfología superficial de esmalte en un modelo de caries in situ. Tesis para optar al título de Cirujano Dentista. Universidad de Chile.

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.

Smith PW, Higham SM, Pretty IA, Edgar WM (2005). The use of in situ models and QLF for the study of coronal caries. *J Dent*. 33: 235-241.

Subramaniam P & Telegeti S (2016). Effect of different concentrations of fluoride varnish on enamel surface microhardness: An in vitro randomized controlled study. *Journal of Indian Association of Public Health Dentistry*, 14(3), 344.

Sung Y, Kim H, Son H, Chang J (2014). How to design in situ studies: an evaluation of experimental protocols. *Restorative dentistry & endodontics*, 39(3), 164–171.

Svensäter G, Borgström M, Bowden GH, Edwardsson S (2003) The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces. *Caries Res.* 2003 Nov-Dec;37(6):395-403.

Tahmourespour A, Kasra-Kermanshahi R, Salehi R (2019). Lactobacillus rhamnosus biosurfactant inhibits biofilm formation and gene expression of caries-inducing Streptococcus mutans. *Dental research journal*, 16(2), 87–94.

Ten Cate A (1998). *Oral histology: development, structure and function*. Vol. 5. St Louis: Mosby; 1998. 218-221

Welch J, Rossetti B, Rieken C, Dewhirst F, Borisy G (2016). Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(6), E791–E800.

Wong A, Subar, Young D (2017). Dental Caries: An Update on Dental Trends and Therapy. *Advances in Pediatrics*, 64(1), 307–330.

Zero D. (1999). Dental caries process. *Dent. Clin. North Am.* 43, 635–664

Zero D. (1995). In situ caries models. *Adv Dent Res*; 9:214-230.

XI ANEXOS**Anexo 1: Ficha clínica**

Evaluación de voluntarios para participación en trabajo de investigación titulado “**Efecto terapéutico en la progresión de caries en un modelo *in_situ* expuesto a probiótico vía sistémica, tópica y mixta**”.

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

Anamnesis

1. Antecedentes mórbidos:

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

 3. Alergias:

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

Examen Intraoral

- Apreciación periodontal
 - Gingivitis: ()
 - Periodontitis: ()
 - Dentición
- C:
- O:

Anexo 2: Consentimiento informado voluntarios

Universidad de Chile

Facultad de odontología

Carta de Consentimiento Informado

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

1. He leído y comprendido toda la información anteriormente entregada y mis preguntas han sido respondidas.
2. He sido informado y comprendo la necesidad y fines de ser atendido.
3. Tengo el conocimiento del procedimiento a realizar.
4. El procedimiento no tiene riesgo alguno para mi salud.
5. Conozco los beneficios de la investigación.
6. Demás 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 necesario y al criterio del investigador.
7. Autorizo a usar mi caso para investigación y para ser usado como material audio visual, protegiendo mi identidad.
8. También comprendo que en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación alguna puedo revocar el consentimiento.
9. En caso de cualquier duda puedo acudir a Sergio Livingstone 943-Independencia; Santiago de lunes a viernes en el horario comprendido entre las 8:00 y 17:00. En el período en la investigación y hasta 6 meses después de concluida esta.
10. Si Ud. Desea consultar sobre los derechos como sujeto de investigación o piensa que estos han sido vulnerados puede dirigir al representante del Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile: Prof. Dr. Eduardo Fernández, al teléfono 29781742, en el 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.

Identificación paciente

Nombre: _____

Rut: _____

Fono: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Sección para 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

Nombre: _____

Rut: _____

Fono: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Nombre del Director del establecimiento de investigación o de su representante

Nombre: _____

Rut: _____

Fono: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Anexo 3: Aprobación comité de ética.



Ed-24 Agosto 2017

ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

INFORME N°:2016/30

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

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

Dr. Eduardo Fernández
Presidente CEC

Dr. Marco Cornejo
Vicepresidente CEC

Dra. Weronika Weil
Miembro Permanente CEC

Sra. Paulina Navarrete
Miembro Permanente CEC

Sr. Roberto La Rosa
Miembro Permanente CEC

Dr. Rodrigo Cabello
Miembro Permanente CEC

Dr. Alfredo Molina
Miembro Permanente CEC

Dra. Paola Llanos
Miembro Permanente CEC

Dr. Juan Estay
Miembro Permanente CEC

Sra. Rebeca Galarce
Representante de la Comunidad

Dra. Viviana Toro
Miembro Alterno CEC

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 Secretaria C.E.C.

Anexo 4: Consentimiento informado para la obtención de terceros molares.



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

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

Investigador Principal: Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez

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

Nombre del Donante

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

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

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



Anexo 5: Protocolo por seguir de voluntarios.

Universidad de Chile
Facultad de odontología
 Protocolo por seguir de los voluntarios

Estimado Participante, bienvenido al estudio 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: es una estructura acrílica removible que tiene incorporadas 10 muestras dentarias: 1 muestra en la zona palatina, 2 muestras en la zona vestibular derecha, 2 muestras en la zona vestibular izquierda, 5 en la zona palatina posterior (fig. 1).



Figura 1: Dispositivo intraoral

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

Ud. deberá utilizar el dispositivo intraoral durante un periodo de 28 días, 24 horas al día. Sólo podrá remover el dispositivo 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, además el dispositivo podrá ser removido máximo 4 veces al día, 30m cada vez.

Al remover el dispositivo almacenarlo en la caja para ello envuelto en 1 cuadrado de toalla de 20x20cm humedecida.

Se recomienda lavarse los dientes al menos dos veces al día, por dos minutos y con pasta ~~fluorurada~~. Durante el periodo de experimentación, se debe evitar el uso de los siguientes elementos:

- Enjuague bucal
- Antiácidos
- Medicamentos (por ejemplo, antibióticos)

En caso de necesitar 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.

Protocolo inicial (generación de lesión artificial):**Paso 1:**

- Al levantarse por la mañana debe realizar la primera aplicación de sacarosa que se encuentra contenida en el frasco. Una vez retirado el dispositivo de la boca, debe aplicar 1 gota de sacarosa en cada una de las muestras. Se debe tener mucho cuidado de evitar que la solución de sacarosa chorree hacia los lados, por lo cual se recomienda mantener el dispositivo de forma horizontal para que el líquido no escurra. Luego de aplicar la gota de sacarosa debe esperar 5 minutos antes de volver a colocar el dispositivo dentro de la boca.

Paso 2:

- Debe continuar aplicando 1 gota de sacarosa en cada una de las muestras, con el dispositivo fuera de la boca, cada 2 horas, hasta completar un total de 8 aplicaciones de sacarosa durante todo el día. Una vez aplicada la gota de sacarosa debe esperar 5 minutos antes de volver a colocarse el dispositivo en el interior de la boca.

Debe recordar aplicar la solución cada 2 horas. Procure que los horarios sean lo más similares posible dentro del periodo experimental, para esto puede poner alarmas. Se le entregará una tabla donde deberá anotar los horarios de aplicación.

En el caso de olvidar alguna aplicación deberá realizarla lo más pronto posible y esperar 2 horas para una nueva aplicación.

Protocolo de intervención probiótico tópico:**Paso 1:**

- Se realizará la primera aplicación de sacarosa, una vez retirado el dispositivo de la boca, debe aplicar 1 gota de sacarosa en cada uno de los bloques de esmalte. Inmediatamente luego de aplicar la gota de sacarosa, debe volver a colocar el dispositivo dentro de la boca.
- Aplicar sacarosa cada 2 horas, 8 veces al día.

Paso 2:

- 2 horas después de la primera aplicación de sacarosa, nuevamente debe retirar el dispositivo de la boca y proceder a aplicar la solución de probiótico (se debe abrir el probiótico ponerlo en el frasco grande y mezclarlo con agua). Debe aplicar 1 gota de probiótico en cada una de las muestras.

Paso 3:

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

Paso 4:

- 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. Una vez aplicada la gota de sacarosa, debe volver a colocarse el dispositivo en el interior de la boca.

Anexo 7: Evaluación de cumplimiento final

Universidad de Chile
Facultad de odontología
 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 periodo experimental
5	Cumplí con todas las aplicaciones con diferencias en los horarios de aplicación de 30 min a 1 hora
6	Cumplí con todas las aplicaciones con diferencias en los horarios de aplicación de 15 a 20 min aproximadamente

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.