

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
ESCUELA DE GRADUADOS**



**“EFECTO DEL *LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS* SP1 EN LA PROGRESIÓN  
DE CARIES EN UN MODELO *IN SITU*.”**

**DANIELA TOBAR  
TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS  
ODONTOLÓGICAS**

**Director de Tesis: Prof. Dr. Gonzalo Rodríguez M.**

**Tutores asociados: Dr. Rodrigo Cabello I., Dr. Mario Díaz D.**

**Santiago - Chile  
2022**



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
ESCUELA DE GRADUADOS**



**“EFECTO DEL *LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS* SP1 EN LA PROGRESIÓN  
DE CARIES EN UN MODELO *IN SITU*.”**

**DANIELA TOBAR  
TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS  
ODONTOLÓGICAS**

**Director de Tesis: Prof. Dr. Gonzalo Rodríguez M.**

**Tutores asociados: Dr. Rodrigo Cabello I. Dr. Mario Díaz D.**

**Santiago - Chile  
2022**

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
ESCUELA DE GRADUADOS

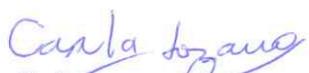
INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER EN CIENCIAS  
ODONTOLÓGICAS

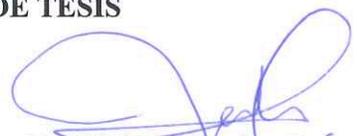
Se informa al Consejo de la Escuela de Graduados de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, que la Tesis de Magíster en Ciencias Odontológicas presentada por la candidata:

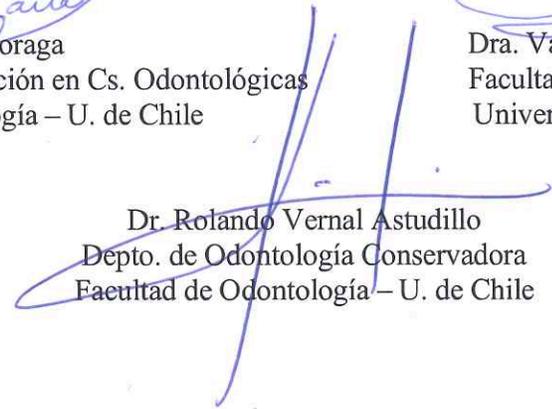
**Daniela Tobar**

ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Odontológicas, en examen rendido el 26 de enero de 2023.

**COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS**

  
Dra. Carla Lozano Moraga  
Instituto de Investigación en Cs. Odontológicas  
Facultad de Odontología – U. de Chile

  
Dra. Valeria Ramírez Lobos  
Facultad de Odontología  
Universidad de Los Andes

  
Dr. Rolando Vernal Astudillo  
Dépto. de Odontología Conservadora  
Facultad de Odontología – U. de Chile

**Dedicatoria:**

Agradezco a mis padres y mi esposo que me apoyaron a lo largo de este arduo camino.

## **Agradecimientos**

A mi papá Luis Tobar y mi mamá Tania Almache, que siempre confiaron en mí y me apoyaron en todo momento. Ustedes son mi ejemplo para seguir, que con su esfuerzo y perseverancia han logrado todo lo que se proponen. Estaré eternamente agradecida con ustedes por todo lo que han hecho por mí. Los quiero mucho.

A mi esposo Daniel Pesántez, que lo amo con todo mi corazón. Él es mi apoyo incondicional y siempre está presente cuando más lo necesito.

Sin la ayuda de ellos nada sería posible, son mi apoyo, mi motivación y fuerza que necesito para seguir adelante, estaré eternamente agradecida con ellos.

A mis profesores tutores, Dr. Gonzalo Rodríguez, Dr. Rodrigo Cabello y Dr. Mario Díaz, por guiarme y enseñarme tantas cosas, me ayudaron a desarrollar paciencia y perseverancia.

## **Declaración**

El presente trabajo de investigación fue realizado con la colaboración de los estudiantes de pregrado de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile; Javier Alonso Naveillan Paulsen, Sophya Consuelo Muñoz Ruiz y Joaquín Eduardo Aliaga, bajo la tutela de los profesores guía, Dr. Rodrigo Cabello Ibacache y Dr. Gonzalo Rodríguez. Dentro de los resultados del mismo, existen datos que son compartidos con los trabajos de investigación titulados: “Efecto en la progresión de lesiones de caries en esmalte en un modelo *in situ*, mediante el uso de probióticos de manera sistémica”; “Efecto del uso del probiótico *Lacticaseibacillus 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” y “Efecto en la progresión de lesiones de caries de esmalte en pacientes que usan el probiótico *Lacticaseibacillus rhamnosus* SP1 de manera tópica, en un modelo *in situ*”, pertenecientes a los alumnos anteriormente mencionados, respectivamente. La información comprendida en este 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 esta y las demás investigaciones.

## Índice

<b>Abstract .....</b>	<b>14</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>16</b>
<b>Caries dental .....</b>	<b>18</b>
<b>Caries dental desde un enfoque ecológico .....</b>	<b>19</b>
<b>Esmalte dental .....</b>	<b>22</b>
<b>Proceso de desmineralización-remineralización .....</b>	<b>24</b>
<b>La saliva .....</b>	<b>26</b>
<b>Probióticos .....</b>	<b>27</b>
<b>Modelos <i>in situ</i> para el estudio de caries .....</b>	<b>35</b>
<b>Métodos para evaluar la microdureza superficial y la densidad mineral.....</b>	<b>37</b>
<b>Planteamiento del problema: .....</b>	<b>38</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>40</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>40</b>
<b>Materiales y métodos .....</b>	<b>41</b>
<b>1.- Tipo de estudio .....</b>	<b>41</b>
<b>2.- Muestra .....</b>	<b>41</b>
<b>3.- Operacionalización de las variables .....</b>	<b>43</b>
<b>4.-Preparación de los bloques de esmalte.....</b>	<b>44</b>

<b>5.- Preparación de los aparatos.....</b>	<b>44</b>
<b>6.- Estandarización de la lesión de caries inducidas <i>in situ</i> y primera fase del estudio .....</b>	<b>45</b>
<b>7- Fase experimental (Segunda fase) .....</b>	<b>47</b>
<b>8.-Aspectos éticos del proyecto.....</b>	<b>49</b>
<b>9.- Medición de los resultados .....</b>	<b>50</b>
<b>10.-Plan de análisis de datos.....</b>	<b>52</b>
<b>Imágenes obtenidas a partir de micro CT y densidad mineral.....</b>	<b>55</b>
<b>Medición de densidad mineral .....</b>	<b>57</b>
<b>Medición de microdureza superficial de Vickers.....</b>	<b>62</b>
<b>Conclusión.....</b>	<b>76</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>85</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla N° 1</b> :Estudios de probióticos en enfermedades orales .....	31
<b>Tabla N° 2</b> : Significancia clínica de estudios que presenta un efecto preventivo frente a la caries dental.....	35
<b>Tabla N° 3</b> : Criterios de inclusión y exclusión .....	43
<b>Tabla N° 4</b> : Operacionalización de las variables .....	43
<b>Tabla N° 5</b> : Intervención grupo sacarosa y grupo control. ....	54
<b>Tabla N° 6</b> : Análisis descriptivo, muestra los valores de la densidad mineral inicial (BMD1) por Micro-CT.. .....	58
<b>Tabla N° 7</b> : Análisis descriptivo, muestra los valores de la densidad mineral obtenida (BMD2) por Micro-CT, primera fase de estudio .....	59
<b>Tabla N° 8</b> : Análisis descriptivo muestra los valores de la densidad mineral obtenida (BMD3) por Micro-CT, de la segunda fase de estudio (probiótico y/o sacarosa). .....	60

## Índice de Figuras

<b>Figura N.º 1:</b> Dispositivo intraoral <i>in situ</i> .....	40
<b>Figura N.º 2:</b> Imagen obtenida por micro CT. ....	45
<b>Figura N.º 3:</b> Análisis de microdureza superficial.....	46
<b>Figura N.º 4:</b> Imágenes obtenidas mediante micro-CT y coloreada.....	49
<b>Figura N.º 5:</b> Imágenes obtenidas mediante Micro-CT .....	50
<b>Figura N.º 6:</b> Análisis de densidad mineral obtenida (BMD3) por micro CT. ....	55
<b>Figura N.º 7:</b> Análisis de microdureza superficial de los bloques de esmalte según el grupo experimental.....	58

## Resumen

La caries dental es una enfermedad multifactorial que se presenta en más de 3.500 millones de personas a nivel mundial, produciendo un impacto negativo en la salud de los individuos. El Plan Nacional de Salud Bucal 2018-2030 publicado por el Ministerio de Salud de Chile, destaca que la caries dental es una patología que afecta mayoritariamente a poblaciones vulnerables con bajo nivel socioeconómico y ruralidad, aumentando su prevalencia con la edad, observando un 17,5% a los dos años hasta 99,4% a los 65 años. La salud oral es parte fundamental de la salud integral del individuo, por lo que es importante priorizar la prevención de la caries dental y la búsqueda de nuevas técnicas que ayuden a detener su progresión. En la actualidad existen varias tecnologías preventivas, una de ellas es la utilización de bacterias probióticas, que presenta un efecto benéfico/protector frente a la caries dental.

El objetivo de este trabajo fue establecer el efecto del *Lacticaseibacillus rhamnosus* SP1 en la disminución de la progresión de lesiones de caries en muestras de esmalte con lesiones de caries inducidas, en un modelo *in situ* expuestos por vía sistémica, tópica y mixta.

Se realizó un estudio *in situ* de dos fases con una duración de catorce días cada una. La muestra fue de 80 bloques de esmalte, distribuidos en 8 voluntarios portadores de un dispositivo intraoral, que contuvo 10 bloques de esmalte en cada uno. En la primera fase del estudio se desarrolló una lesión de caries inducida, posteriormente las lesiones fueron aleatorizadas en cuatro grupos, expuestos a probiótico con una dosis de  $10^8$  UFC/ml (vía

sistémica, tópica y mixta) y/o sacarosa al 20% p/v. Los bloques de esmalte fueron analizados por micro CT, para determinar la densidad mineral en tres periodos de tiempo (inicial, primera fase, segunda fase) y en tres regiones de interés. Además, se analizó la microdureza superficial a través del ensayo de dureza Vickers durante la última fase de estudio. Los resultados muestran que la densidad mineral presentó una diferencia significativa para los grupos con el uso de probióticos (sistémico y tópico 2,17 g/cm<sup>3</sup>, mixto 2,16 g/cm<sup>3</sup>) al comparar con el grupo control (2,05 g/cm<sup>3</sup>). Por otro lado, los análisis de microdureza superficial mostraron que el grupo control (180,59 HV) presentó una disminución de la microdureza superficial a diferencia de los grupos experimentales (sistémico 274,75 HV, tópico 260,96 y mixto 260,49 HV). Mediante estos resultados se demostró que el *Lactocaseibacillus rhamnosus* SP1 disminuye la progresión de lesiones de caries inducidas *in situ*.

## Abstract

Dental caries is a multifactorial disease that occurs in more than 3.5 billion people worldwide, producing a negative impact on the health of individuals. The National Oral Health Plan 2018-2030 published by the Ministry of Health of Chile, highlights that dental caries is a pathology that mostly affects vulnerable populations with low socioeconomic status and rurality, increasing its prevalence with age, observing 17.5% at two years of age up to 99.4% at 65 years of age. Oral health is a fundamental part of the integral health of the individual, so it is important to prioritize the prevention of dental caries and the search for new techniques to help stop its progression. Currently there are several preventive technologies, one of which is the use of probiotic bacteria, which has a beneficial/protective effect against dental caries.

The objective of this work was to establish the effect of *Lactocaseibacillus rhamnosus* SP1 in the reduction of caries lesion progression in enamel samples with induced caries lesions, in an *in situ* model exposed by systemic, topical, and mixed routes.

A two-phase *in situ* study was performed with a duration of fourteen days each. The sample consisted of 80 enamel blocks, distributed among 8 volunteers wearing an intraoral device, each containing 10 enamel blocks. In the first phase of the study an induced caries lesion was developed, subsequently the lesions were randomized into four groups, exposed to probiotic with a dose of 108 CFU/ml (systemic, topical, and mixed route) and/or 20% p/v sucrose. The enamel blocks were analyzed by micro-CT, to determine the mineral density

in three time periods (initial, first phase, second phase) and in three regions of interest. In addition, the surface microhardness was analyzed by Vickers hardness test during the last phase of the study. The results show that the mineral density presented a significant difference for the groups with the use of probiotics (systemic and topical 2.17 g/cm<sup>3</sup>, mixed 2.16 g/cm<sup>3</sup>) when compared to the control group (2.05 g/cm<sup>3</sup>). On the other hand, the surface microhardness analysis showed that the control group (180.59 HV) presented a decrease in surface microhardness in contrast to the experimental groups (systemic 274.75 HV, topical 260.96 and mixed 260.49 HV). These results showed that *Lactocaseibacillus rhamnosus* SP1 decreases the progression of caries lesions induced *in situ*.

## Introducción

La caries dental presenta una alta prevalencia a nivel mundial afectando tanto a adultos como a niños. Según la hipótesis ecológica de placa, los patógenos vinculados con el desarrollo de lesiones de caries están presentes en la superficie dental en una menor cantidad, pero al enfrentar un desequilibrio en la biopelícula se modifican las condiciones medio ambientales, incrementando el número de algunos patógenos que compiten con la microflora comensal logrando niveles de dominancia numérica necesarios para la producción de las lesiones de caries (1,2). Esta patología puede ser prevenida controlando la ingesta de azúcares, utilizando agentes fluorados o controlando directamente a los microorganismos potencialmente patógenos. En este sentido, una estrategia preventiva que ha tomado fuerza en los últimos años es el uso de probióticos, que son una opción no invasiva sin efectos adversos (3).

Los probióticos se encuentran en alimentos de consumo diario como el yogurt, pan de masa madre, soya y algunos tipos de leche. Estos son definidos según la Organización Mundial de la Salud como “*microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas traen beneficios para la salud*” (4). A partir de esto nace el concepto de “bacterioterapia”, término utilizado cuando una cepa se incorpora en la microflora, manteniéndola o restableciendo un microbioma natural por la inhibición o interferencia de algunos microorganismos patógenos (3).

Desde este punto de vista, la evidencia científica ha demostrado que los probióticos pueden mejorar el estado de pacientes con diversas patologías, tales como la gastroenteritis, síndrome de intestino corto, infecciones con *Helicobacter pylori* e infecciones del tracto genitourinario (5). En los últimos años los probióticos han estado en el foco de interés dentro del área de odontología. Se ha utilizado principalmente cepas pertenecientes al género de los *Lacticaseibacillus*, con vehículos para su administración como leche, queso, yogurt, enjuague y gotas, con la finalidad de tratar y prevenir diversas patologías orales como la caries dental, enfermedad periodontal e infecciones como la candidiasis oral (6–8). Una revisión sistemática de la literatura que abarca diferentes tipos de cepas probióticas señala que los probióticos previenen la aparición de nuevas lesiones de caries, además disminuyen la progresión de lesiones de caries y promueven la regresión de caries en la primera infancia (9,10).

A pesar del uso de medios de higiene oral disponibles (cepillos eléctricos, irrigadores orales, hilo dental, etc.), los usuarios de estos dispositivos no son capaces de lograr un buen control de la biopelícula oral, produciendo un aumento de la progresión de lesiones de caries (11). Dado que la caries dental se considera un problema de la salud pública por su alta prevalencia, surge la necesidad de prevenir y disminuir la progresión de lesiones de caries.

En este trabajo se determinará la capacidad del *Lacticaseibacillus rhamnosus* SP1 en disminuir la progresión de lesiones de caries en un modelo *in situ*, con el fin de encontrar estrategias novedosas y eficaces para el control de esta patología.

## **Marco teórico**

### **Caries dental**

La caries es una enfermedad multifactorial, caracterizada por una disbiosis microbiana. Su etiología se define como la pérdida de relación dinámica entre la microbiota residente y el hospedero, relación que se ve interrumpida por cambios en el estilo de vida o alteraciones a nivel de la cavidad oral, alterando el equilibrio dinámico entre los procesos de desmineralización y remineralización del diente (12). Los factores involucrados en la formación de lesiones de caries son factores microbiológicos, biológicos, la composición de la saliva, respuesta inmune, estructura del esmalte, los hábitos de alimentación, determinantes sociales, entre otros (13,14).

Los microorganismos cariogénicos de interés en el desarrollo de las lesiones de caries fermentan los carbohidratos presentes en los alimentos produciendo ácidos orgánicos, tales como el ácido fórmico, acético, láctico y propiónico los cuales se difunden en el esmalte. Esto induce una disolución parcial de los cristales de hidroxiapatita, provocando la destrucción de la microestructura del esmalte terminando eventualmente en una lesión de caries cavitada (2). Este desequilibrio puede ser revertido con un control adecuado de la biopelícula oral, mediante el control del consumo de azúcares, rutina de higiene bucodental y el uso de agentes fluorados. Con estos métodos la lesión de caries puede ser inactivada, es decir, el proceso de desmineralización se interrumpirá sin la necesidad de tratamientos invasivos (15).

## **Caries dental desde un enfoque ecológico**

La biopelícula se define como una comunidad estructurada de bacterias incorporadas en una matriz hidratada que se adhiere a una superficie viva. Estas pueden formarse en respuesta a factores como el reconocimiento de sitios de fijación en una superficie determinada, señales de nutrientes o protección frente a condiciones perjudiciales (16).

La biopelícula dental presenta un “microecosistema” de bacterias que manifiestan una serie de características fisiológicas como la producción de ácido, debido al resultado del metabolismo de los carbohidratos por parte de las bacterias, consiguiendo una disminución del pH y promoviendo la desmineralización de la estructura del diente (1).

Comúnmente en la cavidad oral existe una armonía en el microbioma, pero en ocasiones esta relación puede romperse por la presencia de especies bacterianas con un fenotipo productor de ácido y tolerantes al ácido. Esta ruptura se denomina disbiosis que suele ser consecuencia de un cambio importante en el hábitat que altera el equilibrio entre el microbioma y el hospedero (17).

El principal factor causal de este cambio disbiótico es el consumo frecuente de azúcares, produciendo un inevitable descenso de pH generado por el metabolismo de los carbohidratos, impulsando a la selección de microorganismos productores de ácidos a expensas de las bacterias orales beneficiosas que habitan en un pH neutro. Del mismo modo,

la reducción del flujo de la saliva y la alteración mecánica de la biopelícula producida por la eliminación total de la biopelícula oral provoca cambios similares. El estudio de la caries dental desde un enfoque ecológico muestra que es preciso interferir en los impulsores de la disbiosis para prevenir o controlar la enfermedad, manteniendo un equilibrio ecológico en el microbioma de la biopelícula oral (17).

Desde que la teoría ecológica de placa fue descrita por Marsh se han desarrollado técnicas moleculares para definir los microorganismos presentes a partir de su identificación genómica, basándose en el gen del ARN ribosómico 16S. El ARNr 16S presenta regiones conservadas, que permite que los cebadores universales se dirijan a bacterias, intercaladas con regiones hipervariables específicas de cada especie. Las tecnologías de secuenciación revolucionaron la investigación genómica, estas pueden obtener millones de secuencias parciales del gen 16S ARNr en una sola ejecución de secuenciación, permitiendo la detección de cientos de especies bacterianas orales (18).

Las técnicas de secuenciación han permitido grandes avances en la comprensión de la etiología de la caries dental. En el año 2008 Aas et, al. identificó especies en lesiones iniciales, lesiones dentinarias y lesiones dentinarias profundas en 51 sujetos. Los genes 16S ARNr se amplificaron por PCR, se clonaron y se secuenciaron para determinar la identidad de las especies. Se identificaron especies bacterianas distintas de *S. mutans*, por ejemplo, las especies de los géneros *Veillonella*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*,

*non-S. mutans* de bajo pH, *Actinomyces* y *Atopobium*. Aas destacó que el *S. mutans* no es el principal taxón etiológico en la caries dental y que podría ser una especie minoritaria en los pacientes con caries (19).

En las dos últimas décadas se ha producido un aumento de conocimientos sobre la caries dental con la utilización de tecnologías ómicas. Belda-Ferre et, al. llevó a cabo la primera investigación metagenómica de la biopelícula oral, los datos muestran que la caries dental no está dominada por *Streptococcus mutans*, que era la especie originalmente identificada como agente etiológico de la caries dental años atrás. Demostró que existe una comunidad compleja formada por decenas de especies bacterianas (20). Posteriormente en el año 2015 Belda-Ferre et, al. realizó el primer estudio metaproteómico, en el cual consiguieron cuantificar un total de 7771 proteínas bacterianas y 853 humanas proporcionando el primer repertorio proteico disponible de la placa dental humana (21) .

En el año 2015 Simon-Soro y Mira realizaron una revisión de la literatura de investigación metatranscriptómica en lesiones de caries. Demostraron que existe un ecosistema diverso en el que *S. mutans* representa el 0,02% de los microorganismos activos en las lesiones superficiales dentinarias, el 0,48% en lesiones cavitadas dentinarias y el 0,73% en las lesiones de caries del esmalte, demostrando que el *S. mutans* representa sólo una pequeña fracción de la comunidad bacteriana. Los autores plantean que la caries dental es una enfermedad polimicrobiana, y su etiología va más allá de un único organismo causante,

apoyando el concepto de que los consorcios formados por múltiples microorganismos actúan colectivamente de forma sinérgica, aumentando el efecto de un patógeno para iniciar el desarrollo de lesiones de caries. Un ejemplo de ello es *Veillonella* la cual puede favorecer a las bacterias productoras de ácido en la caries dental a través de la reducción del nitrato (22).

### **Esmalte dental**

El esmalte dental es considerado como el tejido más duro y mineralizado de los mamíferos. Las propiedades ópticas del esmalte se derivan de su estructura y composición, por lo cual la existencia de varios defectos en el desarrollo o influencias ambientales que afectan su estructura suele visualizarse como cambios de color u opacidad. (23).

El esmalte es un tejido que está compuesto en 95% de minerales, 1-2 % de matriz orgánica y de 2-4% de agua (24). La matriz orgánica está constituida principalmente por un componente proteico como las amelogeninas, enamelininas (localizada entre los cristales) y ameloblastinas, todas esenciales para formar un esmalte sano. De las tres proteínas de la matriz del esmalte, la amelogenina es la más investigada. Esto se debe a que su gran abundancia, permite la extracción y purificación de la amelogenina “nativa” de dientes grandes, como los de vacas y cerdos. Sin embargo, un punto a considerar es que la amelogenina es una molécula pequeña, pero muy concentrada en la matriz extracelular y se ha demostrado que presenta una fosforilación en la serina-16, que es de importancia para la mineralización. Esto desempeña un papel clave para la regulación de la fase mineral y la transición de fosfato de calcio amorfo a hidroxiapatita durante la amelogénesis (25,26).

La amelogénesis es un proceso biológico de la formación del esmalte en el cual las proteínas de la matriz extracelular son secretadas por ameloblastos, que posteriormente son degradadas y eliminadas de la matriz. Los ameloblastos regulan la formación de hidroxiapatita dentro del espacio del esmalte mediante un complejo sistema de proteínas (23).

Además, en el esmalte se puede encontrar metaloproteínasa de la matriz 20 (MMP20) y la calicreína 4 (Klk4), que son dos enzimas necesarias para una correcta formación del esmalte y presentan actividad de proteólisis de la matriz colágena. Estas dos proteasas facilitan la eliminación progresiva de las proteínas de la matriz, proporcionando así espacio para el crecimiento de los cristales de apatita y generando una capa de esmalte más dura y menos porosa (25).

La matriz inorgánica está formada por apatita que corresponde a la fórmula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Esta apatita se deposita sobre la matriz del esmalte formando cristales, que presentan una morfología de hexágonos elongados que alcanzan una longitud de 100-1000 nm y un ancho de 30-70 nm. Los cristales de apatita crecen a lo largo de su eje c adquiriendo formas alargadas que se alinean paralelamente entre sí, formando una varilla de esmalte de un diámetro aproximadamente de 2-3 micras y encontrándose cubiertas por una capa delgada de material orgánico de naturaleza proteica. Esta capa orgánica se encuentra en toda la periferia de los prismas, concentrándose mayoritariamente cerca al límite amelo-dentinario (27). Las varillas anteriormente mencionadas forman una estructura entrelazada,

característica clave del esmalte de los mamíferos, proporcionando al esmalte dureza y resistencia a la fractura permitiendo a los dientes funcionar como herramientas para el procesamiento de alimentos (28).

En cuanto a las propiedades físicas del esmalte, estas pueden variar dependiendo de la localización del diente y la edad del paciente. Entre las propiedades principales se encuentra la elasticidad que es la resistencia a la deformación elástica, la cual oscila entre 70-120 gigapascales (GPa). Por otro lado, la dureza es la resistencia superficial de una sustancia a sufrir deformaciones de cualquier índole, esta oscila entre 3 y 6 GPa dependiendo de la edad y localización del diente (29).

### **Proceso de desmineralización-remineralización**

La desmineralización y remineralización es un proceso complejo y dinámico, que ocurre a lo largo de toda la vida en la superficie dentaria. Esta caracterizado por ciclos de pérdida y ganancia mineral que ocurren de forma simultánea en diferentes zonas de un mismo diente (30).

La estructura mineral cristalina de los dientes es desmineralizada por ácidos producidos por bacterias de la biopelícula a partir del metabolismo de carbohidratos fermentables de una dieta alta en azúcares y alimentos con un pH ácido (pérdida de mineral por erosión). Los microorganismos de la biopelícula generan una amplia gama de ácidos orgánicos como ácido láctico, acético, propiónico, butírico y succínico, capaces de liberar iones de hidrógeno

(H<sup>+</sup>) al medio de la biopelícula disminuyendo el pH, permitiendo al ácido desmineralizar el esmalte dental. Como resultado de lo anterior, se produce un aumento de la porosidad del esmalte al ensancharse los espacios entre los cristales de hidroxiapatita junto con la pérdida de mineral, facilitando la difusión de los ácidos hacia el interior del tejido (31,32).

En la superficie del esmalte se encuentra calcio y fosfato producto de la disolución del esmalte, lo cual protegerá parcialmente la superficie dental de una mayor desmineralización. A medida que la desmineralización progresa continua la presencia de ácidos y un descenso de los niveles de pH, provocando una mayor pérdida de contenido mineral lo que resulta en la formación de una lesión sub-superficial que clínicamente se observa cómo una lesión de mancha blanca. Esta es una etapa importante del proceso de formación de lesiones de caries, debido a que la lesión puede detenerse o revertirse, modificando los factores causales o implementando medidas terapéuticas, favoreciendo a la detención de lesiones de caries y permaneciendo como lesiones inactivas. Clínicamente estas lesiones se observan de un aspecto brillante y con pigmentación más oscura, por los cambios de las propiedades ópticas del esmalte (32).

La remineralización es el acumulo de substancia que se produce por depósitos de minerales en los tejidos dentales desmineralizados. Este fenómeno consiste en el remplazo de minerales de la superficie del esmalte, permitiendo que la pérdida previa de los iones de fosfato y calcio puedan ser sustituidos por otros iones provenientes de la saliva, incluyendo también la presencia de fluoruro que contribuye a la formación de cristales de fluorapatita.

La presencia de iones de calcio y fosfato en la saliva juegan un papel importante en el proceso de desmineralización-rem mineralización, favoreciendo al paso de iones que neutralizan la acción de los ácidos (33).

### **La saliva**

Es una solución exocrina compuesta por un 99% de agua, 1% de electrolitos y proteínas, producida continuamente en las glándulas salivares mayores y menores. Entre las principales funciones que cumple la saliva se encuentra la lubricación, protección de tejidos orales y periorales, disolución de azúcares tras la ingesta de alimentos y bebidas, remineralización del esmalte con calcio-fosfato y la capacidad buffer la cual está determinada por el equilibrio de bicarbonato en la saliva (34).

En los procesos de desmineralización y remineralización la pérdida de minerales es restablecida con la saliva, que contribuye a intercambios de iones con sobresaturación de calcio - fosfato a un pH 7 y en presencia de flúor (35). La mayoría de los iones de calcio provienen de la saliva no estimulada procedente de las glándulas submaxilar y sublingual. Por otro lado, la concentración de fosfato de la saliva surge de las glándulas submaxilares que es aproximadamente un tercio de la concentración de la saliva parotídea (36).

La saliva desempeña una importante función en el mantenimiento del equilibrio de los ecosistemas orales, debido a la presencia de algunas proteínas ricas en prolina, lisozima, lactoferrina, aglutininas, e histidina y peroxidasas, las cuales son esenciales de la película adquirida favoreciendo la agregación bacteriana. Además, son fuente de nutrientes para

algunos microorganismos y ejercen un efecto antimicrobiano por la capacidad de modificar el metabolismo bacteriano y la capacidad de adhesión bacteriana a la superficie del diente (36).

La influencia de la saliva en la caries dental es evidente en estudios realizados en pacientes que presentan alteraciones salivales crónicas como el síndrome de Sjögren. Se ha mostrado que en pacientes con este síndrome se manifiesta un mayor riesgo de sufrir caries dental a pesar de las prácticas de salud oral regulares en comparación con la población general (37). La saliva desempeña un papel importante en el mantenimiento de la salud bucal, ayudando a mantener la salud de los tejidos blandos y duros, cuando el flujo salival disminuye se asocia a problemas de la salud oral como lesiones de caries e infecciones orales (34).

### **Probióticos**

La primera referencia de bacterias que contienen beneficios para la salud fue investigada a inicios del siglo XX por Eli Metchnikoff, quien señaló que *“la dependencia de los microorganismos intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles”* (4). Posteriormente Heny Tisser sugirió que el *Bifidobacterium* se debería administrar a pacientes con diarrea para restablecer la flora intestinal (5), y Minoru Shirota aisló una cepa de *Lactocaseibacillus casei* para frenar los brotes de problemas intestinales (5).

En 1989, Fueller definió a los probióticos como “*un suplemento dietético a base de microorganismos vivos que afectan beneficiosamente al huésped mejorando su equilibrio intestinal*” (4). A partir de esta fecha se ha implementado numerosas definiciones, incluso la Organización Mundial de la Salud y la Organización de las Naciones Unidas para Agricultura y la Alimentación, publicaron que los probióticos son microorganismos vivos, que se encuentra naturalmente en algunos alimentos, que administrados en cantidades adecuadas traen beneficios a la salud del hospedero (4).

Teitelbaum y Walker establecieron pautas para considerar un microorganismo como probiótico. Entre las consideraciones destacadas son que los microorganismos deben ser de origen humano, no ser patógenos por naturaleza, ser resistentes a la destrucción por secreciones gástricas, tener capacidad de adherirse al epitelio y ser capaces de colonizar el tracto gastrointestinal. Además de ejercer influencia en algunas actividades metabólicas, como la asimilación del colesterol y producción de vitaminas. (38).

Los mecanismos moleculares exactos de como las cepas probióticas participan en la prevención y el tratamiento de diversas patologías aún son desconocidos. Sin embargo, la investigación tanto *in vitro* como *in vivo* demuestra que el *Bifidobacterium* y *Lactiseibacillus* presentan efectos sobre la función de la barrera del epitelio intestinal. Esto evidenciado por la disminución de la permeabilidad y resistencia intestinal epitelial. Por otra parte, se ha comprobado que el *Bifidobacterium* genera producción de anticuerpos (IgA) y cambios en la inmunidad, incluyendo la presencia de antígenos (39,40).

Los mecanismos de interacción de los probióticos a nivel del sistema inmune son diversos. En el caso de las bacterias lácticas se ha evidenciado que pueden ser captadas por células M, enterocitos especializados en la captación de antígenos presentes en el epitelio gástrico, facilitando la estimulación del tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal. Además, el *Lacticaseibacillus casei* induce a la maduración de células presentadoras de antígeno y a la producción de citocinas IL-10 e IL-12 favoreciendo a una respuesta inmune Th1 (41).

Otros mecanismos de acción de los probióticos se basan en la inhibición directa de patógenos mediante sustancias antimicrobianas (bacteriocinas, peróxido de hidrógeno) o reducción del pH en el lumen intestinal por la producción de ácidos grasos de cadena corta, como el ácido acético, propiónico y butírico. Como una consecuencia de la capacidad fermentativa sobre la fibra dietética, además produce una exclusión competitiva por sitios de unión en el epitelio (3,8). Estos mecanismos de acción son los que median la mayoría de los efectos beneficiosos de los probióticos como en la prevención de alergias, tratamiento de infecciones vaginales, prevención y tratamiento de trastornos gastrointestinales, obteniendo buenos resultados en tratamiento de estas patologías (42,43).

Durante la última década ha surgido un creciente interés por estrategias alternativas, tanto preventivas y terapéuticas en la odontología. Debido a los efectos beneficiosos de los probióticos, estos surgen como una terapia en enfermedades orales. Las bacterias probióticas más utilizadas son los géneros el *Bifidobacterium* y *Lacticaseibacillus* (9). A continuación,

se presenta algunos de los principales estudios que usan cepas probióticas en enfermedades orales (Tabla N° 1).

Estudio	Cepa probiótica	Acción a nivel de la cavidad oral	Vehículo de administración
<b>Riccia et al</b> (44).	<i>L. brevis</i> CD2.	Presenta una disminución de todos los parámetros clínicos de periodontitis en pacientes.	Pastillas por 4 días.
<b>Teughels et al</b> (45).	<i>L. reuteri</i> cepas DSM17938 y ATCC PTA5289	Reducción de la profundidad de las bolsas y aumento de la adhesión en las bolsas moderadas.	Tabletas por 2 semanas.
<b>Shimauchi et al</b> (46)	<i>L. salivarius</i> WB21.	Reducen la acumulación de biopelícula oral, profundidad de la bolsa periodontal, sangrado al sondaje.	Tabletas por 8 semanas.
<b>Kobarake et al</b> (47).	<i>L. helveticus</i> SBT2171.	Disminución la pérdida de hueso alveolar, la inflamación gingival y <i>Porphyromonas gingivalis</i> en la gingival de ratones.	Gomas de masticar por dos semanas.
<b>Näse et al</b> (6)	<i>L. rhamnosus</i> GG.	Redujo significativamente el riesgo de caries dental.	Leche suplementada con probióticos.
<b>G. Rodríguez et al</b> (7).	<i>L. rhamnosus</i> SP1	Redujo significativamente el riesgo de caries dental.	Leche suplementada con probióticos.
<b>C. Stecksén et al.</b> (48)	<i>Lactacaseibacillus rhamnosus</i> LB21	Redujo la caries en niños preescolares con una fracción prevenida del 75%.	Leche suplementada con flúor por 15 meses.

<b>Taipale et al</b> (49).	<i>Bifidobacterium Lactis</i> BB-12	La administración de BB-12 en la infancia no influye en la aparición de lesiones de caries.	Dos tabletas al día.
<b>Colil M.</b> (50), <b>Azán</b> (51)	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> SP1	Efecto preventivo para la formación de caries dental.	Aplicación tópica e ingesta de probiótico por 14 días.
<b>Piwat et al</b> (10)	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> SD1	Revierte nuevas lesiones de caries.	Leche suplementada con probióticos por 6-12 meses.
<b>K Hatakka et al</b> (52).	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG, <i>platarum</i> , <i>paracasei</i> y <i>salivarius</i>	Reducción de la prevalencia de <i>C. albicans</i> tras la toma de probióticos	Queso con probióticos.
<b>Sandoval et al</b> (53).	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> SP1	Efecto preventivo para la formación de caries dental asociado a los niveles de hβD-3 en la saliva.	Leche suplementada con probióticos

**Tabla N° 1** :Estudios de probióticos en enfermedades orales

Los estudios disponibles sobre el uso de probióticos en las patologías bucodentales han tenido resultados favorables. En el caso de las enfermedades periodontales, las bacterias probióticas son capaces de establecerse en la biopelícula e inhibir el crecimiento de patógenos periodontales. Además, disminuyen la cantidad de biopelícula lo que tiene como relevancia una mejora de los parámetros clínicos de la enfermedad periodontal (44,46). En el caso de *Candida albicans* que es el principal factor etiológico de la estomatitis

subprotésica, el consumo regular de probióticos reduce la prevalencia de esta patología en población adulta (52).

Respecto del uso de los probióticos como una herramienta preventiva en el desarrollo de lesiones de caries, los primeros estudios se centraron en el impacto microbiológico, especialmente en la reducción de *Streptococcus mutans* (54). En 2001 Näse et al, realizó un ensayo clínico controlado, cuyo objetivo era evaluar si el *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ( $10^5$  UFC/ml) puede disminuir el riesgo de formar nuevas lesiones de caries. En este ensayo, 595 niños que recibieron leche suplementada con probióticos por 7 meses, obteniendo una reducción de la incidencia de lesiones de caries en la población estudiada (6).

Posteriormente Stecksén et al. en el 2009, ejecutaron un ensayo clínico aleatorio, para estudiar el efecto preventivo del *L. rhamnosus* LB21 ( $10^7$  UFC/ml), sobre la caries dental. Una población de 248 niños de entre 1 y 5 años que ingirieron leche suplementada con probióticos y flúor (2,5 mg/litro) por doce meses. Se evidenció una menor incidencia de caries en preescolares con una fracción preventiva del 75%, a diferencia del grupo control (48). Sin embargo, en este estudio es imposible determinar el efecto únicamente del *Lacticaseibacillus* debido a la utilización de leche suplementada con flúor.

Por otro lado, Rodríguez et al. en el 2016, realizaron un ensayo clínico aleatorizado, para determinar el efecto del *Lacticaseibacillus rhamnosus* SP1 ( $10^7$  UFC/ml) en el incremento de caries, en 261 niños por 10 meses. Obtuvieron una menor incidencia en niños preescolares que ingirieron leche con probióticos sin adición de flúor, lo cual corroboró los resultados

obtenidos por Näse et al. en el 2001 (7). En el año 2019 Colil, Azán y Seguel, determinaron el efecto preventivo del uso de *Lacticaseibacillus rhamnosus* SP1 ( $10^8$  UFC/m vía sistémica, tópica y mixta) en la formación de lesiones de caries en un modelo *in situ* por 14 días, con una muestra que oscila entre 40-90 bloques de esmalte. Demostraron que el *Lacticaseibacillus rhamnosus* SP1 presenta un efecto benéfico/protector frente a los fenómenos de desmineralización (50,51,55).

Wattanarat et al. realizó un estudio clínico para evaluar los niveles de péptido de neutrófilos humanos (HNP1-3) en la saliva, inducidos por la suplementación de *Lacticaseibacillus paracasei* SD1 con una dosis de  $10^8$  UFC/ml. El estudio se realizó en 246 niños por doce meses, cuyos resultados mostraron que los niveles salivales de HNP1-3 son mayores que el grupo control, disminuyendo transitoriamente el recuento de *Streptococcus mutans*, además se evidenció una reducción del riesgo de caries (56). Sandoval et al. en 2020, determinó que el uso de leche suplementada con *Lacticaseibacillus rhamnosus* SP1 ( $10^7$  UFC/ml) afecta a la concentración de hβD-3 en la salival y a la aparición de nuevas lesiones de caries en niños de entre 2-3 años por un periodo de 10 meses. Los resultados mostraron que la ingesta regular de leche suplementada con probióticos disminuyó la aparición de caries dental y los niveles salivales de hβD-3 (53).

En el año 2020 Piwat et al, realizaron un ensayo controlado aleatorio cuyo objetivo era determinar la eficacia de la leche probiótica sobre la progresión y la regresión de lesiones de caries. Administraron leche con *Lacticaseibacillus paracasei* SD1 ( $10^7$  UFC/ml) a niños

entre 1 y 5 años por 6 meses. Concluyeron que el consumo de leche suplementada con probióticos puede prevenir el desarrollo de lesiones de caries y logra considerablemente revertir las lesiones existentes. A continuación, se presenta la incidencia de caries en ensayos clínicos aleatorizados (Tabla N°2).

Estudio	Cepa probiótica	Grupo probiótico Incidencia/ Promedio (SD):	Grupo control Incidencia/ Promedio (SD)	P-valor
<b>Näse et al (6)</b>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG.	6%/NR	8%/NR	NS
<b>G. Rodríguez et al (7).</b>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> SP1	16%/1.1 (1.9)	21%/1.8 (2.4)	<0.05
<b>C. Stecksén et al. (48)</b>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> LB21	11%/0.9 (2.2)	25%/2.2 (3.7)	<0.05
<b>Taipale et al (49).</b>	<i>Bifidobacterium Lactis</i> BB-12	9%/NR	21%/NR	NS
<b>Piwat et al (10)</b>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> SD1	79%/3.6 (4.3)	83%/4.4 (5.4)	NS
<b>Sandoval et al (53).</b>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> SP1	NR/1.3 (1.9)	NR/2.4 (3.1)	<0.05
<b>Wattanarat et al. (56).</b>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> SD1	44.2% NR	25.5%NR	<0.01

**Tabla N° 2:** Significancia clínica de estudios que presenta un efecto preventivo frente a la caries dental. Ensayos clínicos aleatorizados (NR; no registra, NS; diferencias no significativas)

Todos los estudios expuestos anteriormente se realizaron en un periodo desde el 2001 al 2021 en el cual se utilizó el género *Lacticaseibacillus* con diferentes cepas, siendo el vehículo más común la leche y la aplicación directa de probiótico. La frecuencia de administración de todos fue de una vez al día y en ningún de estudio se reportaron efectos adversos al uso de probióticos. Entre los puntos fuertes de las investigaciones destaca el hecho de que todas siguieron rigurosamente el protocolo inicial, los estudios fueron ensayos aleatorios por grupos controlados con placebos y los examinadores clínicos fueron calibrados. La incidencia de lesiones de caries de la primera infancia se vio reducida en todos los estudios realizados, sugiriendo que el uso de bacterias probióticas puede prevenir el desarrollo de caries dental. En el caso de Piwat et al. señala que el uso de probióticos puede revertir las lesiones existentes en niños, entregando evidencia sobre el efecto terapéutico de los probióticos en lesiones de caries existentes (9,10).

### **Modelos *in situ* para el estudio de caries**

Con el fin de estudiar la caries dental actualmente existen varios tipos de modelos que se aplican para obtener respuestas a preguntas de investigación como los modelos *in situ*, *in vivo* e *in vitro*. El uso de modelos *in situ* implica la utilización de dispositivos intraorales,

que simulan procesos de lesiones de caries, sirviendo como puentes entre la situación clínica natural y la situación del laboratorio altamente controlada (57). Los pioneros en trabajar con este tipo de modelos fueron Koulourides y Volker en 1964. Estos modelos son utilizados en el área de la odontología permitiéndonos estudiar los mecanismos de acción del flúor, agentes remineralizantes (58), cariogenicidad de los alimentos (59), efectos preventivos de cepas de probióticos (51), entre otros usos.

Algunas de las ventajas de los modelos *in situ* es que permiten flexibilidad del diseño experimental, existe un factor de costo favorable en comparación con otro tipo de estudios clínicos a largo plazo, son realizados en boca (estado natural del fenómeno) a diferencia de los modelos *in vitro* y crean condiciones ambientales que facilitan el control de las variables de estudio. Por otro lado, las desventajas que presentan estos tipos de estudios, el número de voluntarios es limitado son entre 5-40. Además, el cumplimiento de la fase experimental depende de los voluntarios, por ello la falta de cumplimiento del voluntario puede comprometer los resultados del estudio. Otra característica de los modelos *in situ* es que son de alta calidad, exigentes y requiere experiencia tanto clínica como analítica (57). En cuanto al tipo de tejido duro a utilizar en los dispositivos *in situ* puede ser de origen humano o bovino, preparados en bloque individuales y la superficie del material puede ser pulida, natural o desgastada (57).

## **Métodos para evaluar la microdureza superficial y la densidad mineral**

Existen diversos métodos para evaluar el estado mineral. Entre ellos está la fluorescencia láser, la luz polarizada, micro radiografía transversa, micro CT y pruebas de microdureza como las técnicas de Knoop y Vickers. En este proyecto para medir la densidad mineral se utilizó el micro CT y para la microdureza superficial, la dureza de Vickers.

**Dureza Vickers:** Es una técnica óptima y versátil para medir la microdureza superficial. Permite evaluar la dureza de materiales finos y regiones pequeñas, abarcando un amplio rango de carga. Consta de un indentador de diamante piramidal de base cuadrada el cual se puede utilizar en cualquier tipo de material sin importar su dureza. El procedimiento consiste en ubicar la muestra sobre una plataforma, posteriormente se coloca los parámetros de fuerza, tiempo y se ajusta con el lente del microdurómetro hasta que la superficie se observe nítidamente y se aplica la carga. Para el cálculo de los resultados mide las longitudes diagonales de la impresión obtenidas por el indentador de diamante y posteriormente se aplica la siguiente fórmula (60):

Micro dureza de Vickers fórmula:

- Vickers:  $(VH) = (1,854 \times F) / d^2$
- F= fuerza aplicada
- d=promedio de las diagonales de indentación (mm) (61).

**Micro CT:** También llamada microtomografía computarizada es una técnica de imagen en 3D, que utiliza rayos X para analizar las muestra con una precisión superior al 1% y con una resolución que varía entre 5 y 30nm. Esta técnica permite una evaluación cuantitativa y cualitativa de los tejidos del diente determinando la densidad mineral. En cuanto a su funcionamiento, se genera una fuente de rayos X la cual se transmite a través de la muestra y el detector de rayos X registra una imagen en 2D. Posteriormente se gira la muestra tomando otra imagen y este paso se repite a través de un giro de 180° o 360°. Las imágenes resultantes se procesan para poder reconstruirlas y analizadas mediante programas computacionales (62,63).

**Planteamiento del problema:**

Desde 1989 la Organización Mundial de la Salud ha establecido metas con el fin de mejorar la salud oral, creando estrategias para disminuir las enfermedades bucodentales. Aunque las medidas de la salud pública se han cumplido para el control de enfermedades orales, la caries dental es una de las enfermedades más prevalentes a nivel mundial, siendo la causa principal de pérdida de dientes y por ello es oportuno encontrar métodos terapéuticos que ayude a detener la progresión de caries (12,64).

Considerando que la caries dental es un problema relevante de la salud, este trabajo se centró en la búsqueda de alternativas que complementen los tratamientos actuales de la caries dental, como el uso de probióticos. Numerosos estudios se enfocaron en la utilización de los

probióticos a nivel de la cavidad oral con la finalidad de evaluar la relación de ellos con el desarrollo de nuevas lesiones de caries (9,11).

Por otro lado, Piwat en el 2020 (10) demostró la eficacia del uso de probióticos en la disminución y regresión de las caries en niños, que consumieron leche suplementada con probióticos por 6 meses. Por ello en este trabajo se utilizaron bloques de esmalte con lesiones de caries inducidas, con el fin de evaluar su potencial en disminuir la progresión de lesiones de caries en un modelo *in situ*.

El propósito de este proyecto es proponer el uso de probióticos como una alternativa terapéutica económica y multifuncional (considerando los otros efectos positivos en salud general) para disminuir la progresión de lesiones de caries (64). Por ello la pregunta de investigación es; ¿El uso del *Lacticaseibacillus rhamnosus* SP1 produce una disminución de la progresión de lesiones de caries en muestras de esmalte con lesiones de caries inducidas, en un modelo *in situ* expuestos por vía sistémica, tópica, mixta comparado con el grupo control?

## **Hipótesis**

El uso del *Lacticaseibacillus rhamnosus* SP1 produce una disminución de la progresión de lesiones de caries en muestras de esmalte con lesiones de caries inducidas, en un modelo *in situ* expuestos por vía sistémica, tópica y mixta comparado con el grupo control.

## **Objetivos**

### **Objetivo General:**

Establecer el efecto del *Lacticaseibacillus rhamnosus* SP1 en la disminución de la progresión de lesiones de caries en muestras de esmalte con lesiones de caries inducidas, en un modelo *in situ* expuestos por vía sistémica, tópica y mixta, comparado con el grupo control.

### **Objetivos Específicos:**

1. Determinar la microdureza superficial y densidad mineral de los bloques de esmalte con lesiones inducidas de los grupos experimentales, expuestos a probióticos por vía sistémica, tópica y mixta.
2. Determinar la microdureza superficial y densidad mineral en grupo control.
3. Comparar la microdureza superficial y densidad mineral de los bloques de esmalte con lesiones inducidas de los grupos experimentales y control.

## **Materiales y métodos**

### **1.- Tipo de estudio**

Este fue un estudio experimental *in situ* aleatorizado, ciego y de dos fases de 14 días de duración cada una. Se utilizaron dispositivos intraorales removibles, con una plataforma de acrílico en la cual se insertaron 10 bloques de esmalte humano. Estos dispositivos fueron utilizados por 8 voluntarios sistémicamente sanos que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión. En la primera fase del estudio consistió en la formación de una lesión de caries inducida *in situ*, mediante la instilación de una gota de sacarosa al 20% p/v cada 2 horas con un total de 8 aplicaciones diarias por 14 días. En la segunda fase los bloques de esmalte se esterilizaron y se asignaron aleatoriamente a 4 grupos de estudio. Los voluntarios aplicaron una gota de sacarosa al 20% p/v cada 2 horas con un total de 8 aplicaciones diarias, más la aplicación diaria del probiótico *Lactocaseibacillus rhamnosus* cepa SP1 con una concentración estándar de  $10^8$  UFC/ml en modo sistémica, tópica o mixta exceptuando el grupo control el cual siguió un régimen exclusivo de sacarosa.

### **2.- Muestra**

Para el cálculo muestral se consideró la microdureza superficial como variable primaria de estudio. Para determinar la desviación estándar (DE) común de los cuatro grupos de estudio se tomó el valor más alto de DE perteneciente a la investigación de Colil (50). Con los siguientes aspectos: desviación estándar 32,16; riesgo alfa de 0,05 y un riesgo beta de 0,2 en un contraste unilateral, una tasa estimada de pérdidas de bloques de esmalte del 5%. Se

utilizó 20 bloques de esmaltes para cada grupo teniendo un total de 80 bloques de esmalte, los cuales se distribuyeron en 8 dispositivos intraorales.

Los voluntarios no tuvieron afinidad ni vínculo con ningún de los investigadores que formaron parte del proyecto, encontrándose en total libertad de elección en cuanto al hecho de participar en la investigación. Se tomó en cuenta los siguientes criterios para la elección de los voluntarios:

<i>Criterios de inclusión</i>	<i>Registro</i>
<b>Mínimo de 20 piezas dentales.</b>	Ficha clínica
<b>Pacientes tipo ASA I.</b>	Auto reporte.
<b>Edad 18-30 años.</b>	Auto reporte.
<b>COPD &lt;8.</b>	Ficha clínica

<i>Criterios de exclusión</i>	<i>Registro</i>
<b>Hiposalia.</b>	Ficha clínica
<b>Fumadores.</b>	Auto reporte
<b>Embarazo.</b>	Auto reporte
<b>Portadores de aparatos intraorales.</b>	Ficha clínica
<b>Enfermedad periodontal.</b>	Ficha clínica

<b>Lesiones de caries activas o cavitadas.</b>	Ficha clínica
<b>Uso de antibióticos o antisépticos bucales 6 meses antes.</b>	Auto reporte

**Tabla N° 3:** Criterios de inclusión y exclusión

### 3.- Operacionalización de las variables

A continuación, se muestra las variables del estudio con la escala y medida descriptiva respectiva.

<b>Variable</b>	<b>Definición</b>	<b>Indicador</b>	<b>Escala</b>	<b>Medida descriptiva</b>
<b>Microdureza superficial.</b>	Es la capacidad que tiene la superficie de una sustancia para resistir la indentación de una punta bajo una carga, esta constituye un indicador de la calidad del esmalte (65).	Micro dureza de Vickers formula: $VH = 1,85 \times F/d^2$ F= fuerza aplicada D=promedio de las diagonales de indentación (mm)	Continua.	Media y desviación estándar.
<b>Densidad mineral.</b>	Es la medida de Cantidad de minerales que se encuentran en el diente. El contenido mineral del esmalte está representado por el fosfato de cálcico e hidroxiapatita (66).	Microtomografía de rayos X.	Continua.	Media y desviación estándar

**Tabla N° 4:** Operacionalización de las variables

#### **4.-Preparación de los bloques de esmalte**

Se utilizaron terceros molares extraídos que se encontraban incluidos, los cuales se evaluaron minuciosamente para descartar anomalías de esmalte. Posteriormente los molares fueron almacenados en timol al 2% por un mes como máximo en refrigeración a 5°C. Los bloques se cortaron con un disco de acero diamantado, con las medidas de 3x3x3 mm. Luego se pulieron con piedras de carburo de silicio de grado 600-4000g, fueron limpiados con ultrasonido y se colocaron en autoclave por 20 min a 120°C (67). La preparación de los bloques de esmalte y de los dispositivos *in situ*, fue realizada en el laboratorio central ubicado en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

#### **5.- Preparación de los aparatos**

El diseño consistió en un dispositivo intraoral removible ubicado en el maxilar superior, confeccionado con acrílico de termopolimerización, con dos plataformas en la zona vestibular de los molares superiores y una en la zona del paladar. Presentó un total de 10 cavidades las cuales fueron distribuidas de la siguiente forma; 9 cavidades de 4x4 en la zona vestibular y palatina (izquierda y derecha) y una ubicada en la zona palatina de los incisivos centrales (68).

Los bloques de esmalte fueron analizados previamente mediante micro-CT y se montaron individualmente usando cera adhesiva en el dispositivo *in situ*. Todos los bloques fueron numerados desde la zona derecha vestibular a la zona posterior palatina (Figura N°1).



**Figura N.º 1:** Dispositivo intraoral *in situ*, de acrílico de termopolimerización.

#### **6.- Estandarización de la lesión de caries inducidas *in situ* y primera fase del estudio**

Para estandarizar las lesiones de caries inducidas *in situ*, se realizó un estudio experimental *in situ* de 14 días de duración. Se necesitaron 15 bloques de esmalte en el grupo de estudio y 15 en el grupo control. Para el cálculo muestral se tomó en consideración la variable primaria de estudio (Microdureza superficial) con los siguientes aspectos; desviación estándar 42.8 (69), riesgo alfa de 0.05, un riesgo beta de 0.2 en un contraste unilateral y una tasa de pérdidas de seguimiento del 5%.

Los voluntarios utilizaron un dispositivo intraoral removible, en donde se insertaron los bloques de esmalte de 3x3x3mm. Posteriormente se dividió en dos grupos, grupo control y grupo de estudio. El grupo de estudio debía retirar el dispositivo de la cavidad oral y aplicar una gota de sacarosa al 20% en cada una de las muestras, posteriormente colocaron nuevamente el dispositivo dentro de la cavidad oral. La instilación fue cada dos horas con

un total de ocho aplicaciones al día en todos los bloques de esmalte, mientras que el grupo control no se administró un desafío cariogénico.

Evaluación clínica de los voluntarios e indicaciones del dispositivo fue la siguiente:

- Elaboración de la historia clínica del paciente la cual contenía los antecedentes, alergias, medicamentos, hábitos, alimentación, examen intraoral completo e índice COPD.
- Condición periodontal la cual se evaluó con una sonda periodontal (OMS).
- Se impartió una charla para instrucciones de higiene oral del participante y del dispositivo.
- Todos los voluntarios firmaron un consentimiento informado.

Indicaciones del dispositivo:

- El dispositivo fue utilizado día y noche por un periodo de 14 días, el tiempo máximo para mantenerlo fuera de boca es de 30 minutos.
- Los voluntarios debían retirarse el dispositivo durante la alimentación e higiene oral, la alimentación se mantuvo un régimen normal de dieta.
- Durante el periodo de experimentación los voluntarios no utilizaron enjuague bucal, antiácidos ni medicamentos.

Se evaluaron los bloques de esmalte mediante micro-CT. La estandarización de la lesión de caries inducidas se realizó con el fin de tener un protocolo establecido y funcional, con mediciones confiables de los cambios minerales producidos.

En la estandarización de lesiones de caries *in situ* se evidenció una mayor pérdida de densidad mineral en el grupo de sacarosa en comparación con el grupo control presentándose un fenómeno poco variable. Por ello, este protocolo se utilizó para la formación de la lesión de caries inducida *in situ* en la primera fase experimental por un periodo de 14 días en 80 bloques de esmalte distribuidos en 8 dispositivos intraorales.

#### **7- Fase experimental (Segunda fase)**

Previo al inicio de la fase experimental se analizaron todos los bloques de esmalte mediante micro-CT.

Terminada la primera fase, los bloques de esmalte fueron recolectados, se limpiaron, y esterilizaron mediante autoclave por 20 min a 120°C. Todos los bloques de esmalte fueron colocados en pocillos individuales enumerados y analizados con micro CT, utilizando el equipo SKYSCAN1272 de Bruker® usando los softwares SkyScan Data Viewer, CTan y CTvox3D para visualizarlos, reconstruirlos y medir la densidad mineral, con el fin de determinar la presencia de caries inducidas *in situ*.

Posteriormente las muestras fueron aleatorizadas mediante el programa Microsoft Excel en cuatro grupos, tres de consumo de probióticos/sacarosa (vía sistémica, tópica o mixta) y un grupo control con sacarosa. Todos los bloques de esmalte se reincorporaron a los

dispositivos intraorales y se entregaron a los voluntarios para continuar con la segunda fase experimental.

Los grupos de estudio (probiótico/sacarosa) colocaron en los bloques de esmalte una gota de sacarosa al 20% p/v, cada dos hora con un total de ocho aplicaciones diarias (desafío cariogénico), junto con una dosis de *Lacticaseibacillus rhamnosus* cepa SP1 con una concentración estándar de  $10^8$  UFC/ml. El protocolo de uso de probiótico en el grupo sistémico consistió en retirar el dispositivo de la cavidad oral e ingerir una 150ml de agua en la que se suspendieron una dosis de  $10^8$  UFC/mL de *L. rhamnosus* SP1 y posteriormente los voluntarios enjuagaron la cavidad oral con abundante agua.

En el grupo tópico se aplicó 1 gota de probiótico (0,083 uml) en todos los bloques, con el dispositivo fuera de la cavidad oral. El grupo mixto los voluntarios ingirieron 150ml de agua en la que se suspendieron dosis de  $10^8$  UFC/mL de *L. rhamnosus* SP1 con el dispositivo fuera de la cavidad oral, colocaron una gota de *Lacticaseibacillus rhamnosus* SP1 en todas las muestras. La aplicación del probiótico se realizó una vez al día junto con la segunda instilación de sacarosa con el dispositivo fuera de la cavidad oral.

Los voluntarios siguieron el protocolo anteriormente mencionado, junto con las siguientes indicaciones; el dispositivo intraoral solo se retiró de la cavidad oral por 30 minutos como máximo al momento de ingerir alimento y lo usaron todo el día incluso durante la noche. A todos los voluntarios se les entrego el protocolo según el grupo de estudio

Se registró el cumplimiento del protocolo de estudio y los problemas con el dispositivo a todos los voluntarios mediante llamadas telefónicas y la información se registró en uno de los formularios pertinentes (**Anexo 1.** Protocolo por seguir de los voluntarios, **Anexo 2.** Evaluación de cumplimiento y Evaluación de cumplimiento final).

### **8.-Aspectos éticos del proyecto**

De acuerdo con la ley 20.584, párrafo 7 de la protección de la autonomía de las personas, participantes de una investigación científica, el artículo 21 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”* (70). En base al cumplimiento de dicho artículo se realizó un consentimiento informado (**Anexo 3:** Consentimiento informado). Convocados los voluntarios se realizó una charla, en la cual se explicó los objetivos del estudio, criterios de exclusión e inclusión, se instruyó sobre su salud oral y el uso del dispositivo intraoral. Además, si los participantes no desearan seguir con el proyecto, podrían desistir en cualquier momento.

En cuanto para la donación de los terceros molares se realizó en el “Instituto Nacional de Ortodoncia”. Se entregaron los consentimientos informados a pacientes mayores de 18 años que acudieron a este centro de atención odontológica, además se proporcionó una breve explicación sobre la investigación (**Anexo 4:** Consentimiento donación de molares). Una

vez obtenido los molares se evaluó cada uno de ellos con el fin de no encontrarse con ninguna anomalía.

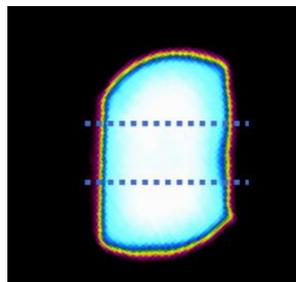
Por otro lado según el artículo 22 de la misma menciona; *“Mediante un reglamento expedido por el Ministerio de Salud, en los términos de la ley N°20.120, se establecerán las normas necesarias para regular los requisitos de los protocolos de investigación y los procedimientos administrativos y normas 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”* (70). Es por ello por lo que se entregó el protocolo de estudio al Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (**Anexo 5**: Acta de aprobación del protocolo).

## **9.- Medición de los resultados**

Densidad mineral: Se utilizó el micro-CT (Skyscan 1278, Aartselaar, Bélgica) ubicado en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, con el fin de calcular la densidad mineral en tres periodos de tiempo. La calibración del nivel de gris se realizó con esmalte de las muestras control como guía para determinar los valores de densidad mineral de diferentes partes del diente (71). En cuanto a las condiciones de irradiación fueron las

siguientes; voltaje de 50 kV, una fuente de corriente de 1005 uA, 1mm de filtro de Aluminio y el tiempo de exposición fue de 45 minutos (72).

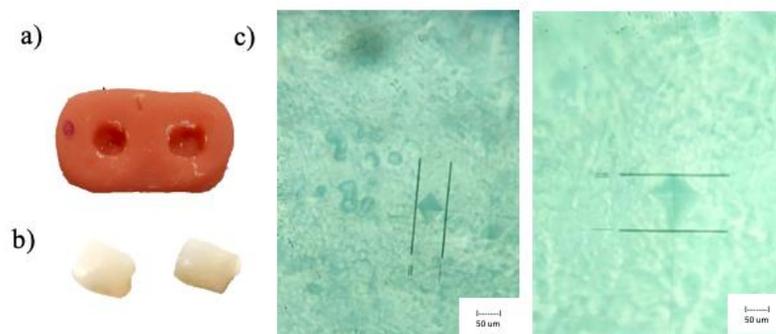
Cada muestra se montó individualmente, todos en la misma posición procurando que el haz de rayos x incida perpendicularmente a la superficie. Durante el proceso de escaneo las muestras rotaron 360° en incrementos angulares de 0,25, el cual generó 1400 proyecciones (66). Las imágenes se guardaron como un archivo de imagen con formato 16 bits Tagged Image File Format y fueron exportadas a un programa para la reconstrucción tomográfica 3D NRecon versión 1.7.4.2 y SkyScan. En cuanto al análisis cuantitativo de la densidad mineral se realizó con el programa CT Analyser. En cada bloque de esmalte, se marcó tres regiones de interés (ROI) y los valores obtenidos de los ROI se promediaron (Figura N°3).



**Figura N° 2:** Imagen obtenida por micro CT, se marcó tres regiones de interés; superior, media e inferior.

Microdureza superficial: Las muestras fueron previamente hidratadas con timol al 2% por 48h, posteriormente se introdujeron los bloques de esmalte en una base de acrílico con cera adhesiva (Figura: N°4: a, b).

Se midió la microdureza superficial utilizando una indentación de diamante de Vickers, Duramin Struers Corp ubicado en la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile. Se realizaron 3 muescas para cada bloque de esmalte, con una carga de 1.961 Newton durante 10 segundos. Las muescas se realizaron en el centro, el extremo superior e inferior de la superficie del bloque de esmalte (Figura: N°4 c). Los valores fueron calculados por el equipo utilizando la fórmula de microdureza superficial (Vickers:  $(VH) = (1,854 \times F) / d^2$ ) (60,61) y se consideró el promedio de las tres mediciones como el valor que se asignó a la muestra.



**Figura N° 3:** Análisis de microdureza superficial. a) base de acrílico, b) bloques de esmalte, c) muescas realizadas por un indentador de diamante. Las imágenes fueron obtenidas mediante Duramin, Struers Corp.

### 10.-Plan de análisis de datos

El análisis de datos fue ciego a cargo de la investigadora principal. Todos los bloques de esmalte presentaban un ID del grupo de estudio, pero para la medición de los resultados

todos los bloques de esmalte fueron colocados en pocillos numerados del 1-80 con el fin de desconocer el grupo de tratamiento al que pertenece al momento de analizar los bloques de esmalte.

En la presente investigación se realizó el análisis de datos en tres fases:

- Auditoria de datos: Se usó el programa Excel, colocando restricciones de valores en las celdas utilizadas con el fin de minimizar el error en la transcripción de datos. Se revisaron los datos en tres ocasiones en busca de inconsistencias que podrían tener su origen en la digitación de datos.
- Descriptiva: Se utilizó la prueba de Shapiro Wilk para conocer si las variables presentan una distribución normal. Para la descripción de los datos se utilizaron medidas resumen como media y desviaciones estándar para la densidad mineral y microdureza superficial. En caso de las variables que no presentan una distribución normal de los datos, se utilizó la mediana como medida resumen.
- Analítica: para los datos distribuidos de forma paramétrica, se realizó la comparación de grupos de estudio con ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Por otro lado, los datos que no presentan una distribución paramétrica, se realiza el análisis de Kruskal-Wallis, para el análisis de los grupos independientes y el análisis de comparaciones múltiples. Para todos los análisis se consideró un 95% de confiabilidad y un  $p < 0.05$  para considerar las diferencias estadísticamente significativas.

## Resultados

### **Estandarización de formación de lesiones de caries inducidas *in situ*.**

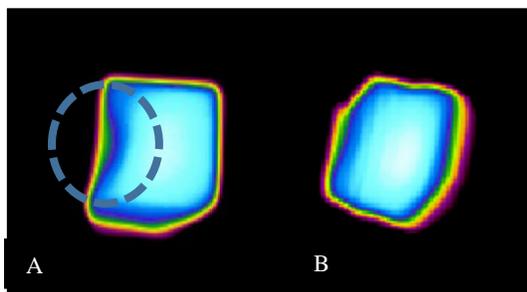
Tras los 14 días de la fase de estandarización, al comparar los grupos de estudio se encontraron diferencias estadísticamente significativas. El análisis del grupo experimental (sacarosa) mostró un 31% de pérdida de contenido mineral comparado con el grupo control (Tabla N°5).

<b>Grupos de estudio</b>	<b>Media (gr/cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Desviación estándar</b>
Control	2,75 *	0,06
Sacarosa	1,90 *	0,10

\*p < 0,001.

**Tabla N° 5:** Intervención grupo sacarosa al 20% p/v por 14 días cada dos horas (n=15) y grupo control sin exposición a sacarosa (n=15). Valores obtenidos mediante micro-CT tras 14 días de estudio. Análisis para comparar dos grupos independientes se realizó con T-Student.

En la imagen coloreada obtenida del grupo de estudio se pudo observar una discreta área de desmineralización correspondiente al área expuesta (Figura N°4.A). Al comparar con la zona de control no se encontró mayores alteraciones (Figura N°4.B). Demostrando que fue posible generar una lesión de caries inducida *in situ*. Consecuentemente, el mismo protocolo que se utilizó en este estudio.



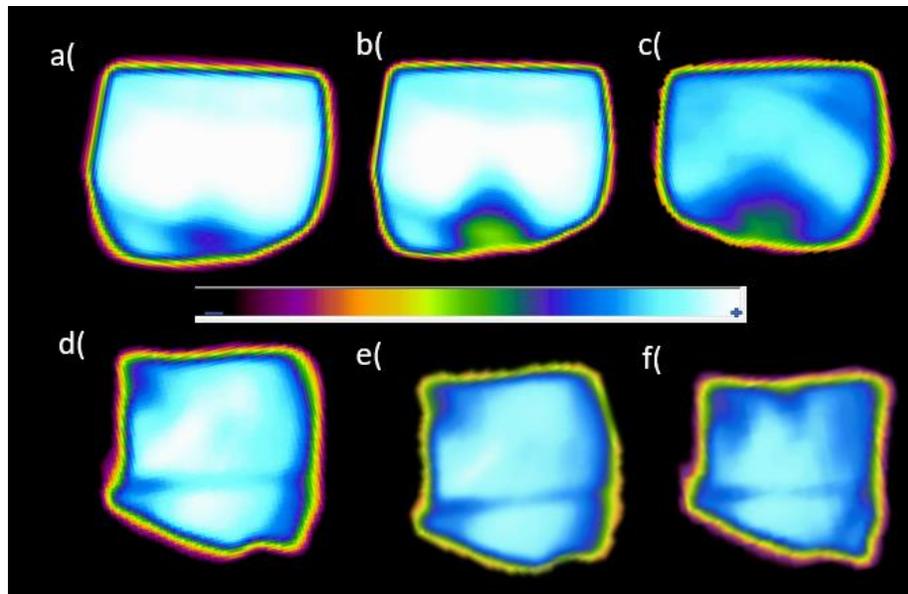
**Figura N.º 4:** Imágenes obtenidas mediante micro-CT y coloreada. (a) Bloque de esmalte sometido a sacarosa al 20% p/v por 14 días cada dos horas con un total de 8 aplicaciones diarias, se puede evidenciar una ligera desmineralización. El círculo entre punteado enseña la formación de la lesión de caries inducida *in situ*. (b) Bloque de esmalte del grupo control.

**Imágenes obtenidas a partir de micro CT y densidad mineral.**

Mediante micro CT se obtuvieron imágenes que permitieron visualizar las superficies de los bloques de esmalte, correspondientes a los grupos experimentales (probiótico/sacarosa) y control (sacarosa), para realizar un análisis de forma cuantitativa y cualitativa. A todos los bloques de esmalte se aplicó un código de colores para visualizar las zonas de pérdida de densidad mineral según los grupos de estudio (figura Nº5).

La formación de la lesión de caries inducida *in situ* (primera fase de estudio) se observa una zona de desmineralización (figura Nº5 b y d). En la segunda fase de estudio se evidenció una menor pérdida de densidad mineral en los grupos de exposición probiótico/sacarosa (figura Nº5 c). El grupo control presentó una zona de desmineralización mayor,

evidenciando un aumento de pérdida de densidad mineral comparado con el grupo de estudio (figura N°5 f).



**Figura N.º 5:** Imágenes obtenidas mediante Micro-CT en el Software Ctan.A (voltaje de 50 KV y corriente de 1005uA). Son imágenes representativas de los tres grupos experimentales, al no existir diferencias significativas en los grupos de expuesto a probiótico/sacarosa. a) BMD1(densidad mineral) del bloque de esmalte sano. b) BMD2 primera fase (lesión inducida). c) BMD3 segunda fase de estudio expuesto a probiótico (sistémico). d) BMD1 del bloque de esmalte sano. e) BMD2 primera fase de estudio (lesión inducida), bloque de esmalte del control. f) BMD3 del bloque de esmalte control expuesto a sacarosa.

## **Medición de densidad mineral**

Previo al estudio se cuantificó la densidad mineral de todos los bloques de esmalte por micro CT, posteriormente las muestras fueron instaladas en los dispositivos intraorales y entregados a los voluntarios para dar inicio a la primera fase de estudio por 14 días. Transcurrido este periodo de tiempo las muestras fueron recolectadas y escaneadas por micro CT, para cuantificar la densidad mineral corroborando la formación de lesiones inducidas *in situ*. Los bloques de esmalte fueron limpiados, esterilizados y aleatorizados a los grupos de estudio por el programa Excel. Se insertaron nuevamente las muestras en el dispositivo *in situ* para dar comienzo a la segunda fase de estudio. Existió tres grupos expuestos a probiótico/sacarosa (vía sistémica, tópica y mixta) y un grupo control expuesto a sacarosa exclusivamente.

Transcurrido los 14 días de estudio se cuantificó la densidad mineral final, que permitió visualizar la superficie control y la superficie expuesta según el grupo experimental, permitiendo realizar la cuantificación respectiva. Previo a todos los análisis estadísticos se utilizó la prueba de Shapiro Wilk para conocer si las variables presentan una distribución normal. Los valores de densidad mineral inicial (BMD1) y la densidad mineral de la primera fase del estudio (BMD2), presentaron una distribución normal, realizando el análisis de ANOVA. A diferencia de la densidad mineral de la segunda fase de estudio (BM3) y los valores de microdureza superficial, los cuales no presentaron una distribución normal, por lo cual se realizó el análisis de Kruskal Wallis.

El análisis inicial de la densidad mineral de los bloques de esmalte obtuvo un promedio de 2,90 g/cm<sup>3</sup>, presentando diferencias estadísticamente significativas en el grupo sistémico y control (Tabla N°6.).

<i>Grupos de estudio</i>	<i>Media Inicial BMD1 (g/cm<sup>3</sup>)</i>	<i>Desviación estándar</i>	<i>n</i>
<b>Mixto</b>	2,91	0,13	20
<b>Tópico</b>	2,90	0,13	20
<b>Sistémico</b>	2,97*	0,11	20
<b>Control</b>	2,82*	0,05	20

\*p<0,05

**Tabla N° 6 :** Análisis descriptivo, muestra los valores de la densidad mineral inicial (BMD1) por Micro-CT. Análisis inicial de la media de Bone Media Density (BMD) de los 4 grupos de estudio, se realizó con ANOVA esto considerando que los datos se distribuyen de manera normal.

En cuanto a la primera fase de estudio, consistió en la formación de una lesión inducida mediante la aplicación de sacarosa al 20% p/v cada dos horas con un total de 8 aplicaciones diarias por 14 días de duración. Se obtuvo un promedio total de 2,36 g/cm<sup>3</sup>, sin diferencias estadísticamente significativas (Tabla N°7.).

<i>Grupos de estudio</i>	<i>Media (g/cm<sup>3</sup>) BMD2</i>	<i>Desviación estándar</i>	<i>n</i>
<b>Mixto</b>	2,38	0,15	19
<b>Tópico</b>	2,34	0,10	19
<b>Sistémico</b>	2,32	0,13	19
<b>Control</b>	2,38	0,13	20

**Tabla N° 7:** Análisis descriptivo, muestra los valores de la densidad mineral obtenida (BMD2) por Micro-CT, primera fase de estudio (formación de lesión inducida de caries). Análisis de comparación de la media de Bone Media Density (BMD) en 4 grupos de estudio se realizó con ANOVA. Las diferencias no son significativas.

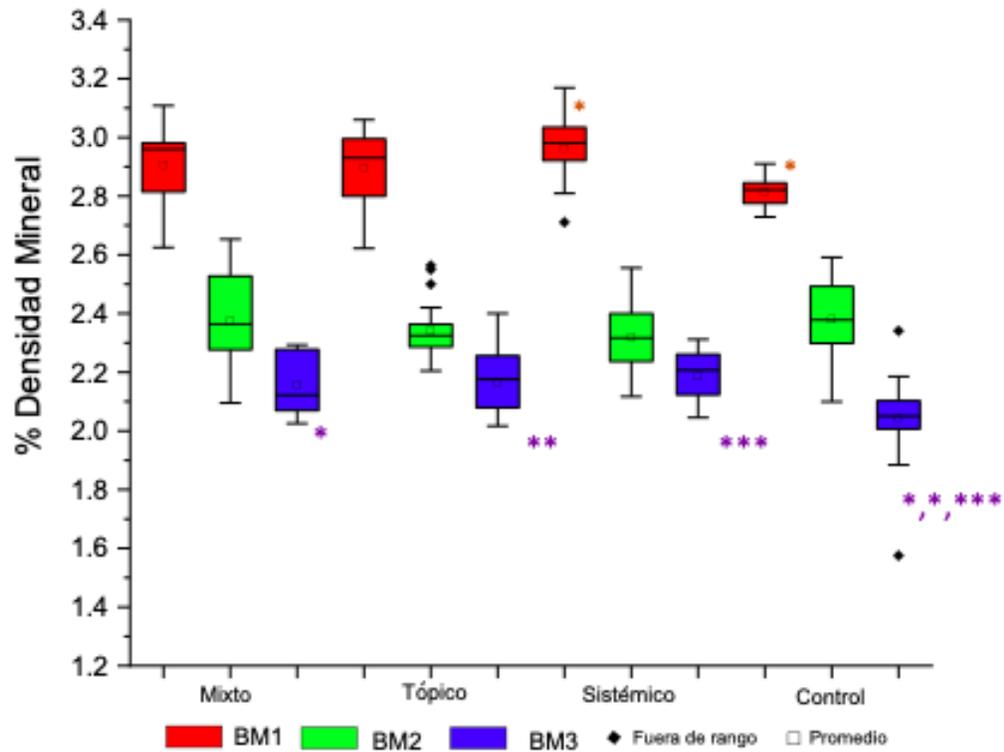
El análisis de la segunda fase del estudio consistió en la administración de sacarosa al 20% p/v (8 aplicaciones, cada dos horas) junto con una aplicación diaria de probiótico con una concentración estándar de  $10^8$  UFC/ml, vía sistémica, tópica, mixta y control (aplicación de sacarosa). El grupo control obtuvo un valor menor de densidad mineral comparado con los demás grupos de estudio, con un promedio de 2,05 g/cm<sup>3</sup>. Los resultados presentaron diferencias estadísticamente significativas con relación al grupo control, pero no existió diferencias significativas entre los grupos de exposición de probiótico/ sacarosa (Figura N°8).

<i>Grupos de estudio</i>	<i>Media (g/cm<sup>3</sup>) BMD3</i>	<i>Desviación estándar</i>	<i>n</i>
<b>Mixto</b>	2,16*	0,10	19
<b>Tópico</b>	2,17**	0,11	19
<b>Sistémico</b>	2,17***	0,09	18
<b>Control</b>	2,05*, **, ***	0,15	20

\*p<0,05

**Tabla N° 8:** Análisis descriptivo, muestra los valores de la densidad mineral (BMD3) por Micro-CT, de la segunda fase de estudio (probiótico y/o sacarosa). Análisis de comparación de 4 grupos de estudio se realizó con Kruskal Wallis considerando la distribución no paramétrica de los datos.

Al comparar las medias de densidad mineral de la primera fase y la segunda, se pudo evidenciar que el grupo control obtuvo una mayor pérdida de densidad comparado con los demás grupos de probiótico/sacarosa (Figura N°6).

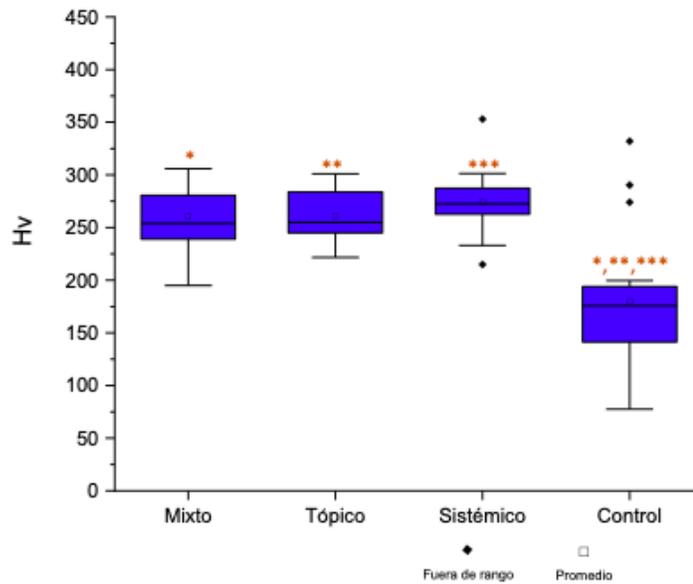


\*p<0,05

**Figura N.º 6:** Análisis de comparación de 4 grupos de estudio (probiótico y/o sacarosa). Los asteriscos (\*) naranja representan que existieron diferencias significativas en el grupo sistémico y control. Los asteriscos (\*) púrpuras representan diferencias significativas de los grupos de estudio (probiótico y/o sacarosa) con referencia al grupo control.

## Medición de microdureza superficial de Vickers

Se midió la microdureza superficial de los boques de esmalte por un indentador de diamante Vickers. Previo al análisis las muestras fueron hidratadas por 24h con timol al 0.2%. Los valores obtenidos de microdureza superficial fueron de 180,59 unidades de Vickers (HV) para el grupo control, 260,29 HV grupo mixto, 260,96 HV grupo tópico y de 274,75 HV en el grupo sistémico (figura N°7).



\* $p < 0,05$

**Figura N.º 7:** Análisis de microdureza superficial de los bloques de esmalte según el grupo experimental. El análisis de comparación de 4 grupos de estudio se realizó con Kruskal Wallis considerando la distribución no paramétrica de los datos. Se muestran las diferencias

significativas luego de realizar el análisis de comparación múltiple. Los asteriscos (\*) naranja representan diferencias significativas de los grupos de estudio (probiótico y/o sacarosa) con referencia al grupo control.

## Discusión

En este estudio se determinó el efecto de la administración del *Lactocaseibacillus rhamnosus* SP1 vía sistémica, tópica y mixta sobre lesiones de caries inducidas *in situ*, en un periodo de 14 días. La densidad mineral de las muestras de esmalte insertas en los dispositivos *in situ* fue evaluada en tres instancias, previo al inicio del estudio, posterior a la formación de la lesión de caries inducida y al culminar la fase experimental, en esta última fase, se incluyó un estudio de la microdureza superficial del esmalte. En el transcurso de la investigación se extraviaron cuatro bloques de esmalte, correspondientes al 5% del total de muestras, valor que se encuentra dentro del margen de pérdida establecido al realizar el cálculo muestral.

Previo al inicio del estudio se estandarizó la formación de lesiones de caries inducidas por un periodo de 14 días administrando sacarosa al 20%. Por otro lado, se evaluó de forma cuantitativa y cualitativa la densidad mineral presente en las muestras de esmalte mediante imágenes obtenidas por micro CT. Los resultados obtenidos mostraron una pérdida de densidad mineral del 31% en comparación con el grupo control, con una desviación estándar de 0,10 demostrando que es un proceso estable y homogéneo.

Antes de iniciar la formación inducida de lesiones de caries, se evidenció que todos los bloques de esmalte presentaron una densidad mineral que oscila entre 2,97-2,82 gr/cm<sup>3</sup>, con un promedio de 2,90 gr/cm<sup>3</sup>. Al realizar el análisis ANOVA, se evidenciaron diferencias significativamente estadísticas en los grupos de control y sistémico, sin embargo, estas diferencias no repercutirían en el estudio de manera negativa, debido a que, al inducir las

lesiones de caries en la primera fase experimental, la densidad mineral resultó homogénea entre los grupos de estudio, sin evidenciar diferencias estadísticamente significativas.

Los valores anteriormente indicados son similares a los reportados por otros autores, como Birgit et, al. el cual evaluó la mineralización del esmalte sano en 10 incisivos permanentes humanos con el fin de crear un patrón de mineralización, obtuvo valores de densidad mineral que oscilan entre 3,00 - 2,78 g/cm<sup>3</sup> (73). Dowker et, al. en el 2003 realizó un estudio longitudinal del desarrollo 3D de las lesiones del esmalte subsuperficial en molares humanos, los valores de densidad mineral oscilaron entre 2,1-2,7 g/cm<sup>3</sup> (74). Posteriormente Dowker et, al en el año 2006 realizó un estudio para determinar la morfología tridimensional de las fisuras de los dientes humanos y cuantificar la distribución de minerales en el esmalte, los valores obtenidos de densidad mineral en dientes sanos se encontraron en el rango de 2,7-2,9 g/cm<sup>3</sup>. (75).

Por otro lado, Cochrane et, al. caracterizó lesiones de esmalte y superficies de esmalte sano, midiendo el contenido mineral, desde la superficie hasta la base de esta. Obtuvieron un promedio de densidad mineral de dientes sanos de 3.15 g/cm<sup>3</sup> (76). Los valores reportados por Cochrane no coinciden con los obtenidos en este estudio, sin embargo, coinciden con las investigaciones de Dowker y Birgit.

La primera fase de estudio consistió en la formación de lesiones de caries, mediante un desafío cariogénico (sacarosa al 20% p/v por 14 días). El análisis de densidad mineral mostró valores entre 2,32-2,38 g/cm<sup>3</sup>, los cuales no presentaron diferencias significativas entre los

4 grupos de estudio. Los resultados obtenidos coinciden con los estudios realizados por Dowker et, al. anteriormente mencionado, que obtuvo un valor de 1,4–2.7 g/cm<sup>3</sup> de densidad mineral en molares humanos extraídos con lesiones de esmalte iniciales (manchas blancas) (74). Todas las lesiones de caries examinadas en los estudios de Dowker tenían un contenido mineral máximo en la capa superficial, y estos máximos variaban entre el 74% y el 100% del esmalte sano, con una mediana del 92% (74,75).

Azán, realizó un estudio *in situ* de 14 días de duración, expuso bloques de esmalte a sacarosa al 20%, para inducir una lesión de caries *in situ*, los valores de densidad mineral de los bloques de esmalte fueron de 2,1-2,41 gr/cm<sup>3</sup> (51). Las investigaciones realizadas por Dowker y Azán evidencian que los valores de densidad mineral obtenidos en este estudio corresponden a una lesión de caries, por lo cual se dio inicio a la segunda fase experimental.

En la segunda fase experimental los bloques de esmalte fueron aleatorizados en cada grupo de estudio, e insertados en los dispositivos intraorales, esta fase permitió comparar los efectos del probiótico en un tejido afectado por una lesión de caries. Se evidenció una menor pérdida de minerales de los bloques de esmalte que fueron sometidos a *Lactocaseibacillus rhamnosus* SP1, en comparación con el grupo control, corroborado de forma cuantitativa como cualitativa. Considerando que los cuatro grupos de estudio fueron sometidos a un desafío cariogénico, los resultados muestran que el uso regular de *L. rhamnosus* SP1 de forma tópica, sistémica y mixta, produce una disminución de la progresión de las lesiones de caries inducidas, controlando la pérdida de cantidad mineral en comparación con el grupo

control. Estos datos se corroboraron mediante imágenes obtenidas por micro CT, las cuales al ser analizadas mostraron diferencias significativamente estadísticas en relación con el grupo control.

En la actualidad no existen estudios que hayan evaluado el efecto del *L. rhamnosus* SP1 sobre una lesión de caries inducida *in situ*. No obstante, Piwat et, al. realizó un ensayo clínico controlado y aleatorizado en niños tailandeses con una alta prevalencia de caries, para demostrar la eficacia del consumo de leche en polvo reconstituida con *L. paracasei* SD1. Evidenciaron que el consumo de probiótico previno nuevas lesiones de caries y revirtió considerablemente las lesiones de caries en comparación con el grupo control (10). Este fue un estudio clínico y no se analizó la densidad mineral y microdureza superficial, pero el resultado obtenido fue similar al del presente estudio.

Junto con el análisis de densidad mineral, se evaluó la microdureza superficial método elemental para valorar la desmineralización de la superficie dentaria. Los resultados obtenidos fueron de 260-274 HV para los grupos experimentales (probiótico/sacarosa) y 180,59 HV para el grupo control (sacarosa). Se evidenció que los grupos de exposición probiótico/sacarosa presentaron una mayor microdureza superficial en relación con el grupo control con una diferencia del 32%. Este análisis demostró que los bloques de esmalte expuestos a probiótico/sacarosa presentan una mayor resistencia ante los procesos de desmineralización propios de la caries dental.

No existen estudios que evalúen la microdureza superficial de bloques de esmalte en un modelo de caries *in situ* posterior al uso de probiótico. Sin embargo, las investigaciones *in situ* de Azán (51) y Colil (50) en el 2019 utilizaron bloques de esmalte con una superficie sana para evaluar el potencial preventivo del *L. rhamnosus* SP1. Los valores de microdureza superficial del grupo control de los bloques de esmalte oscilan entre 156,5 - 172,4 HV y los grupos de exposición a probiótico presentaron un rango de 209,17 - 254,2 HV. Los resultados reportados por estos autores coinciden con los resultados obtenidos en este estudio.

Cabe destacar que los valores de microdureza superficial para dientes sanos son de 320-400 HV según el estudio de Craig y sugiere que valores inferiores a 300 HV en el esmalte dental es considerado como una lesión de caries, por lo cual el modelo de caries *in situ* realizado en esta investigación es considerado como una lesión de caries (77). Considerando los datos de Craig, Azán y Colil para dientes sanos, el grupo control obtuvo una pérdida de microdureza superficial del 39% a diferencia de los grupos de exposición a probiótico/sacarosa que fue del 13%, esto demuestra que el *Lacticaseibacillus rhamnosus* SP1 disminuye la tasa de progresión de lesiones de caries en esmalte en un modelo *in situ*.

En el estudio publicado por Elgamily y Safwat et, al. se evaluó de manera *in vitro* el potencial antibacteriano y de remineralización del esmalte, tratado con pastas dentales preparadas con diferentes mezclas de nano fosfopéptidos de caseína, nano fosfato de calcio amorfo y el probiótico *Lacticaseibacillus rhamnosus* B-445. Entre los resultados más relevantes se

evidenció que la pasta dental con probiótico a los 7 días de estudio presentó un aumento del 54% de la microdureza superficial en comparación con las muestras que no fueron expuestas a probióticos. El primer día presentó una microdureza de 63,9 HV y al culminar los 7 días aumento a 117,4 HV (78). Aunque los valores obtenidos en este estudio difieren de los de Safwat et, al. es evidente que el uso del probiótico *Lacticaseibacillus rhamnosus* se relacionada un efecto benéfico sobre la microdureza superficial.

Por otro lado, existen ciertos estudios que proponen que los probióticos pudieran ser altamente cariogénicos. En tal sentido Schwendicke concluyo que el *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG presenta un efecto cariogénico en un modelo *in vitro* de biopelícula dental. Los resultados obtenidos mostraron una mayor pérdida mineral cuando el *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG estaba en presencia del *Streptococcus mutans*, evidenciando un potencial de cariogenicidad. Los investigadores atribuyen este resultado a la compleja ecología de las biopelículas orales *in vitro* y a la pérdida de las muestras durante la preparación y el análisis. Además consideran que los resultados podrían ser diferentes si se hubiera incluido otras especies orales en el estudio (79).

Los modelos *in situ* se comenzaron a utilizar en el año 1964 por Koulourides, para estudiar los mecanismos de acción del flúor y posteriormente se adaptó para la investigación de alimentos cariogénicos y el efecto de los productos derivados de la leche (80). Young-Hye realizó una revisión en la cual menciona; que entre los años 2003 y 2012 se han realizado

más de 191 publicaciones en modelos *in situ*, proporcionando un alto nivel de evidencia, pero recalcando la importancia de estandarizar cualquier procedimiento que se realice en estos modelos (81).

Los modelos *in situ* facilitan el control de las variables experimentales y permiten una flexibilidad del diseño experimental, proporcionando la integración de diversas técnicas analíticas, aumentando la sensibilidad y la validez científica del estudio (57). Los parámetros experimentales clave a considerarse en el desarrollo de un modelo *in situ*, son las características de los voluntarios, el diseño del modelo, los aspectos éticos, tipo de tejido, método de evaluación del estado mineral, diseño de estudio y el protocolo clínico (57). El cumplimiento del último parámetro depende de la rigurosidad del voluntario, por esta razón en el estudio se llevó un registro de las aplicaciones de sacarosa y probiótico de cada uno de los voluntarios. Cada uno de los parámetros de los modelos *intraorales* fueron cuidadosamente seleccionados, para la elección del número de bloques de esmalte, duración y dosis (7,50,51).

En la investigación realizada se demostró que el modelo *in situ* de caries fue capaz de materializar un proceso biológico complejo, como son las lesiones de caries sobre bloques de esmalte dental. Con el modelo *in situ* fue posible identificar una nueva estrategia para disminuir la progresión de lesiones de caries. Sin embargo, un aspecto a mejorar dentro de la investigación es la pérdida de las muestras que se encontraban en el dispositivo intraoral.

La adherencia de los bloques de esmalte con la cera adhesiva no es perfecta, es decir la manipulación del dispositivo provoca un desajuste de las muestras y posteriormente su caída o pérdida de estas.

El efecto del uso de probióticos en patologías de la cavidad oral ha sido estudiado demostrando efectividad en su uso (82–84). Un reciente meta-análisis evaluó nueve publicaciones y obtuvo una mediana de la incidencia de caries en los grupos de prueba fue de probióticos de 8,5% en comparación con los grupos placebo que obtuvieron un valor de 17,5% (la diferencia fue estadísticamente significativa). Los probióticos evaluados fueron *Lactocaseibacillus* y *Bifidobacterium* que demostraron no presentar efectos adversos durante ensayos clínicos, considerándolos en general, seguros y tolerados. Dato que se evidenció en la presente investigación en el cual ningún participante reportó efectos adversos al uso del probiótico.

Sin embargo, los probióticos presentan contraindicaciones de uso en pacientes inmunodeprimidos, enfermedades autoinmunes y pacientes sometidos a procedimientos de trasplantes de órganos tratados con inmunosupresores (85). Los efectos adversos más comunes son el malestar abdominal por distensión y la flatulencia, pero desaparecen con el uso continuo de probióticos. Los efectos adversos poco frecuentes son la bacteriemia provocada a partir de la ingestión de *Lactocaseibacillus*, sin embargo, la incidencia de esta es inferior en 1 por cada millón de usuarios. El riesgo de desarrollar fungemia a partir de *S. boulardii* se estima en 1 por cada 5,6 millones de usuarios. Los pacientes que corren un

mayor riesgo de presentar fungemia son los que se encuentran en estado crítico, altamente inmunocomprometidos o aquellos con catéteres venosos centrales colocados. Los casos de bacteriemia y fungemia por probióticos han respondido bien al tratamiento antibiótico o antifúngico adecuado (86).

Los *Lacticaseibacillus* son especies de bacterias gram-positivas, anaerobias facultativas o microaerófilas con forma de bacilo. Abarca una amplia variedad de organismos que representan la mayor parte del grupo de bacterias lácticas. La cepa SP1 utilizada en el estudio es un clon del *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG, que anteriormente fue considerada como una subespecie de *Lacticaseibacillus casei*, sin embargo, investigaciones posteriores permitieron considerarla como una especie separada. La cepa GG se aisló en una muestra de intestino humano en 1985 y fue la primera cepa perteneciente del género del *Lacticaseibacillus* que fue patentada gracias a la capacidad de sobrevivir y proliferar a pH ácido gástrico y de adherirse a los enterocitos (87,88). Ha sido estudiada por 33 años, siendo una de las cepas probióticas más utilizadas y documentadas, mostrando su efecto sobre la salud, prevención y el tratamiento de infecciones gastrointestinales y alergias (87).

Los mecanismos de acción de las bacterias probióticas son variados entre los cuales se puede destacar, la capacidad de competir con las bacterias cariogénicas para colonizar la biopelícula oral, producción de sustancias antimicrobianas como el peróxido de hidrogeno y bacteriocinas, capacidad de adherencia a la mucosa oral favoreciendo a un crecimiento de grupos bacterianos asociados a una simbiosis oral y disminución del recuento de *S. mutans*

(3,8). Además el uso de probióticos estimulan a la producción de h $\beta$ D3 a partir de las células epiteliales ductales de las glándulas salivales y posteriormente secretadas por la saliva (56).

Estos mecanismos de acción favorecen la presencia de un ecosistema microbiano oral re-equilibrado conduciendo a un aumento del pH de la interfaz diente biopelícula, lo que podría contribuir a una disminución de la progresión de caries. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el probiótico permanece un corto periodo de tiempo en la cavidad oral presentándose de forma transitoria en la saliva, por este motivo actualmente se cree que el mecanismo de acción de los probióticos se asocia con una comunicación bidireccional entre las células del estroma intestinal y la microbiota, lo que contribuiría al desarrollo de respuestas inmunitarias y a la activación de diferentes vías de señalización celular, incluidas las que intervienen en la respuesta inmunitaria a nivel de la cavidad oral (89). Esta comunicación podría ser mediada por vesículas extracelulares (MV), estas son una forma de comunicación intracelular y extracelular utilizada por arqueas, bacterias y eucariotas. (89,90).

Las MV han sido descritas en el género *Lactocaseibacillus rhamnosus* (JB-1) y *L. plantarum* y se ha propuesto que la regulación inmunitaria por parte de las MV de las bacterias lácticas está implicada en la señalización entre las bacterias intestinales probióticas y sus huéspedes mamíferos (91). Algunas MV de bacterias presentan la capacidad de atravesar la barrera epitelial intestinal, para llegar a sitios más allá del tracto gastrointestinal y ejercer su función (92).

Las bacterias lácticas son potenciales organismos promotores de la salud oral, pero son especies aisladas de nichos distintos al lugar de donde ejercen su acción y están presentes de forma transitoria en la saliva. Los microorganismos orales asociados a condiciones de salud podrían ser más eficaces que las especies probióticas asociadas al intestino, como es el caso de *Streptococcus dentisani*. Esta bacteria fue aislada de la biopelícula de individuos libres de caries en el año 2014 por Alex Mira et, al. (93). Esta especie presenta una doble acción probiótica, inhibido el crecimiento de patógenos orales por la producción de bacteriocinas y amortiguando el pH ácido extracelular. El *Streptococcus dentisani* se considera un probiótico potencial contra la caries dental, sin embargo se necesitan más estudios para corroborar su eficacia (94).

Las limitaciones del presente estudio fueron la imposibilidad de realizar un inicio simultáneo con todos los voluntarios en la fase experimental, lo que fue ocasionado por un retraso del laboratorista y la presencia de contacto estrecho de COVID-19. En cuanto a las complicaciones reportadas de parte de los voluntarios durante el periodo experimental, algunos voluntarios reportaron incomodidad al usar el dispositivo y dificultades horarias para la aplicación de la sacarosa, sobre todo en los feriados del 2021, viajes y trabajo.

Dentro de esta línea de investigación se sugiere seguir con estudios en modelos *in situ* de lesiones de caries inducidas, en búsqueda de una mayor exposición de los bloques de esmalte con distintas cepas probióticas que proporcione efectos terapéuticos o/y preventivos. Posiblemente una intervención con probióticos más la aplicación de flúor o con la

combinación con prebiótico podría llegar a inhibir la progresión de caries e incluso reversarlas, pero se necesita investigaciones adicionales sobre la eficacia de esta combinación. Además, se desconoce las cepas precisas para lograr un máximo efecto del probiótico y el mecanismo mediante los cuales los probióticos ejercen su función, por lo cual también se debería avanzar la investigación en esta área.

## **Conclusión**

El uso de *Lactocaseibacillus rhamnosus* SP1 independientemente de la vía de administración produce una disminución de la progresión de los fenómenos de desmineralización en una lesión de caries inducida *in situ* y no provoca efectos secundarios considerándose seguros para la salud.

Resultados como estos muestran que los probióticos podrían ser utilizados con un enfoque novedoso para la prevención y tratamiento de la caries dental, considerando además que tienen múltiples beneficios comprobados para la salud general.

Con el fin de lograr potenciar los efectos de los probióticos se hace necesario seguir investigando en el uso combinado de múltiples cepas o de simbióticos, ya sea en más estudios *in situ* o clínicos aleatorios.

## Bibliografía

1. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: Ecological perspectives. *J Dent Res.* 2011;90(3):294–303.
2. Featherstone JDB. The continuum of dental caries - Evidence for a dynamic disease process. *J Dent Res.* 2004;83(SPEC. ISS. C):2002–5.
3. Fierro-Monti C, Aguayo-Saldías C, Lillo-Climent F, Riveros-Figueroa F. Rol de los Probióticos como Bacterioterapia en Odontología. Revisión de la Literatura. *Odontoestomatología.* 2017;19(30):4–13.
4. FAO and OMS. Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. FAO Library Discovery. Roma; 2006.
5. Guarner F, Sanders ME, Israel RE, Canadá RF, Sudáfrica JG, Turquía TK, et al. Probióticos y prebióticos. Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología. España; 2017.
6. Nase L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Pönkä A, Poussa T, et al. Effect of Long-Term Consumption of a Probiotic Bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in Milk on Dental Caries and Caries Risk in Children. *Caries Res.* 2001;35(6):412–20.
7. Rodríguez G, Ruiz B, Faleiros S, Vistoso A, Marró ML, Sánchez J, et al. Probiotic compared with standard milk for high-caries children. *J Dent Res.* 2016;95(4):402–7.
8. Angarita Díaz M del P. Probióticos y su relación con el control de caries. Revisión de tema. *Rev Fac Odontol.* 2016;28(1):179–202.
9. Twetman S, Jørgensen MR. Can probiotic supplements prevent early childhood caries? A systematic review and meta-analysis. *Benef Microbes.* 2021;12(3):231–8.
10. Piwat S, Teanpaisan R, Manmontri C, Wattanarat O, Pahumunto N, Makeudom A, et al. Efficacy of Probiotic Milk for Caries Regression in Preschool Children: A Multicenter Randomized Controlled Trial. *Caries Res.* 2020;54(5–6):491–501.
11. Laleman I, Teughels W. Probiotics in the dental practice: a review. 2015;46(3):255–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25485319>
12. Zhan L. Rebalancing the Caries Microbiome Dysbiosis: Targeted Treatment and Sugar Alcohols. *Adv Dent Res.* 2018;29(1):110–6.
13. Eden E. Evidence-Based Caries Prevention. Editor EE, editor. Springer. Turkey:

Springer International Publishing Switzerland; 2016. 83–84 p.

14. Frencken JE. Dental caries and caries epidemiology. Evidence-Based Caries Prevention (Springer). 2016 Jan;1–11.
15. Richards W. Carious lesion activity assessment in clinical practice. Evid Based Dent. 2019;20(2):39.
16. Thurnheer, Thomas ; Paqué PN. Biofilm Models to Study the Etiology and Pathogenesis of Oral Diseases. In: Eick S, editor. Oral Biofilms. Suiza; 2021. p. 30–7.
17. Pitts NB, Twetman S, Fisher J, Marsh PD. Understanding dental caries as a non-communicable disease. Br Dent J. 2021;231(12):749–53.
18. Moussa DG, Ahmad P, Mansour TA, Siqueira WL. Current State and Challenges of the Global Outcomes of Dental Caries Research in the Meta-Omics Era. Front Cell Infect Microbiol. 2022;12(June):1–23.
19. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. J Clin Microbiol. 2008;46(4):1407–17.
20. Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simón-Soro A, Pignatelli M, et al. The oral metagenome in health and disease. ISME J. 2012;6(1):46–56.
21. Belda-Ferre P, Williamson J, Simón-Soro Á, Artacho A, Jensen ON, Mira A. The human oral metaproteome reveals potential biomarkers for caries disease. Proteomics. 2015;15(20):3497–507.
22. Simón-Soro A, Mira A. Solving the etiology of dental caries. Trends Microbiol. 2015;23(2):76–82.
23. Lacruz RS, Habelitz S, Wright JT, Paine ML. Dental enamel formation and implications for oral health and disease. Physiol Rev. 2017;97(3):939–93.
24. Einer Villarreal Becerra. Función de las sustancias antioxidantes sobre esmalte blanqueado con peróxido de hidrógeno ante la adhesión inmediata de composites y sus cambios estructurales y morfológicos superficiales. [Barcelona ]: Universidad de Barcelona; 2004.
25. Gil-Bona A, Bidlack FB. Tooth enamel and its dynamic protein matrix. Int J Mol Sci. 2020;21(12):1–25.
26. Brookes SJ, Diekwisch TGH, Wald T, Margolis HC, Yamazaki H, Beniash E, et al. Protein Phosphorylation and Mineral Binding Affect the Secondary Structure of the

- Leucine-Rich Amelogenin Peptide. *Front Physiol.* 2017;1:450. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
27. Welborn VV. Enamel synthesis explained. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(36):21847–8.
  28. Shin NY, Yamazaki H, Beniash E, Yang X, Margolis SS, Pugach MK, et al. Amelogenin phosphorylation regulates tooth enamel formation by stabilizing a transient amorphous mineral precursor. *J Biol Chem.* 2020;295(7):1943–59.
  29. Camilo A, Rivera V, Ossa A, Arola D. Revista Ingeniería Biomédica Fragilidad y comportamiento mecánico del esmalte dental. *Rev Ing Biomed.* 2012;6:Volumen 6, número 12, julio-diciembre 2012,.
  30. Simeonov M, Gussiyska A, Mironova J, Nikolova D, Apostolov A, Sezanova K, et al. Novel hybrid chitosan/calcium phosphates microgels for remineralization of demineralized enamel – A model study. *Eur Polym J.* 2019;119(July):14–21.
  31. Castellanos JE, Alejandra G, Rubio C, Bosque E, Bosque E. La remineralización del esmalte bajo el entendimiento actual de la caries dental Enamel Remineralization under the Current Caries Understanding. *Univ Odontol.* 2013;32(69):49–59.
  32. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Prim.* 2017;3(May).
  33. Carrillo Sánchez C. Desmineralización y remineralización. *Rev ADM.* 2010;67(1):30–2.
  34. Dodds M, Roland S, Edgar M, Thornhill M. Saliva A review of its role in maintaining oral health and preventing dental disease. *BDJ Team [Internet].* 2015;2(1–8):1–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bdjteam.2015.123>
  35. Jocelyn Carolina P-L, Wendolaine S-C, Héctor R-R, Carlos J. Salivary characteristics and dental caries: Evidence from general dental practices. *J Am Dent Assoc.* 2013;5(2):144.
  36. Llena Puy C. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis Carmen. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006 [cited 2021 Dec 16];11(5):449–55.
  37. Fox PC, Bowman SJ, Segal B, Vivino FB, Murukutla, Choueiri K, et al. Oral involvement in primary Sjögren syndrome. *J Am Dent Assoc.* 2008;139(12):1592–601.
  38. Teitelbaum JE, Walker WA. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annu Rev Nutr [Internet].* 2003 Nov 28 [cited 2022 Jul 8];22:107–38.

39. Alarcón P, González M, Castro É. Rol de la microbiota gastrointestinal en la regulación de la respuesta inmune. *Rev Med Chil.* 2016;144(7):910–6.
40. Resta-Lenert S, Barrett KE. Probiotics and commensals reverse TNF- $\alpha$ - and IFN- $\gamma$ -induced dysfunction in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 2006;130(3):731–46.
41. Claudia Manzano A, Diana Estupiñán G, Elpidia Poveda E. Efectos clínicos de los probióticos: Qué dice la evidencia. *Rev Chil Nutr.* 2012;39(1):98–110.
42. Rutten N, Van der Gugten A, Uiterwaal C, Vlieger A, Rijkers G, Van der Ent K. Maternal use of probiotics during pregnancy and effects on their offspring's health in an unselected population. *Eur J Pediatr.* 2016;175(2):229–35.
43. Olveira Fuster G, González-Molero I. Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. *Nutr Hosp.* 2007;22(SUPPL. 2):26–34.
44. Riccia DND, Bizzini F, Perilli MG, Polimeni A, Trinchieri V, Amicosante G, et al. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. *Oral Dis* 2007.
45. Teughels W, Durukan A, Ozcelik O, Pauwels M, Quirynen M, Cenk Haytac M. Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study . *J Clin Periodontol* 2013.
46. Shimauchi H, Mayanagi G, Nakaya S, Minamibuchi M, Ito Y, Yamaki K, et al. Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Periodontol.* 2008 Oct 1;35(10):897–905.
47. Kobatake E, Kobayashi R, Kabuki T, Kurita-Ochiai T. *Lactobacillus helveticus* SBT2171 upregulates the expression of  $\beta$ -defensin and ameliorates periodontal disease caused by *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Immunol.* 2019;63(8):293–302.
48. Stecksén-Blicks C, Sjöström I, Twetman S. Effect of long-term consumption of milk supplemented with probiotic lactobacilli and fluoride on dental caries and general health in preschool children: A cluster-randomized study. *Caries Res.* 2009;43(5):374–81.
49. Taipale T, Pienihäkkinen K, Alanen P, Jokela J, Söderling E. Administration of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in Early Childhood: A Post-Trial Effect on Caries Occurrence at Four Years of Age. *Caries Res.* 2013 Sep;47(5):364–72.

50. María Paz Colil Orellana. Efecto del uso tópico del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* sp1 en un modelo de caries in situ. Repositorio académico de la Universidad de Chile 2019.
51. Azán NJ. 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. Universidad De Chile. Universidad de Chile; 2019.
52. Hatakka K, Ahola AJ, Yli-Knuutila H, Richardson M, Poussa T, Meurman JH, et al. Probiotics reduce the prevalence of oral *Candida* in the elderly a randomized controlled trial. *J Dent Res* [Internet]. 2007.
53. Sandoval F, Faleiros S, Cabello R, Díaz-Dosque M, Rodríguez G, Escobar A. The consumption of milk supplemented with probiotics decreases the occurrence of caries and the salivary concentration of hβD-3 in children. *Clin Oral Investig*. 2020.
54. Laleman I, Detailleur V, Slot DE, Slomka V, Quirynen M, Teughels W. Probiotics reduce mutans streptococci counts in humans: A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig*. 2014;18(6):1539–52.
55. Johanny Giovanni Seguel Valenzuela. 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. Universidad de Chile; 2019.
56. Wattanarat O, Makeudom A, Sastraruji T, Piwat S, Tianviwat S, Teanpaisan R, et al. Enhancement of salivary human neutrophil peptide 1-3 levels by probiotic supplementation. *BMC Oral Health*. 2015;15(1):1–11.
57. Zero DT. In situ caries models. *Adv Dent Res*. 1995;9(3).
58. João-Souza SH, Bezerra SJC, de Freitas PM, de Lima NB, Aranha ACC, Hara AT, et al. In situ evaluation of fluoride-, stannous- and polyphosphate-containing solutions against enamel erosion. *J Dent*. 2017;63(April):30–5.
59. Wefel JS. Effects of fluoride on caries development and progression using intra-oral models. *J Dent Res*. 1990;69(SPEC. ISS. FEB.):626–33.
60. Struers S en E. Ensayos de dureza Vickers. 2020. Available from: <https://www.struers.com/es-ES/Knowledge/Hardness-testing/Vickers>
61. Kelić K, Matic S, Marović D, Klarić E, Tarle Z. Microhardness of bulk-fill composite materials. *Acta Clin Croat*. 2016;55(4):607–14.
62. Schwass DR, Swain M V., Purton DG, Leichter JW. A system of calibrating microtomography for use in caries research. *Caries Res*. 2009;43(4):314–21.

63. Shahmoradi M, Swain M V. Micro-CT analysis of naturally arrested brown spot enamel lesions. *J Dent* 2017;56:105–11.
64. Ministerio de Salud. Plan Nacional de Salud Bucal 2018-2030. Dep Salud Bucal 2017.
65. Fernández E, Abbiati N, Cabrera J, Martínez R. Microdureza del esmalte dental en incisivos centrales permanentes de dos genotipos bovinos. *Rev MVZ Córdoba*. 2011 Jan;16(1):2310–6.
66. Shahmoradi M, Swain M V. Micro-CT analysis of naturally arrested brown spot enamel lesions. *J Dent*. 2017;56:105–11.
67. João-Souza SH, Bezerra SJC, de Freitas PM, de Lima NB, Aranha ACC, Hara AT, et al. In situ evaluation of fluoride-, stannous- and polyphosphate-containing solutions against enamel erosion. *J Dent* 2017.
68. Fernanda, Muñoz Sepúlveda. “ Modelo in situ de caries dental : Estudio piloto .” Repositorio académico de la Universidad de Chile; 2019.
69. Carolina F, Sepúlveda M. “ Modelo in situ de caries dental : Estudio piloto .” Repositorio académico de la Universidad de Chile, 2019.
70. Gobierno de Chile. Ley de Derechos y Deberes del Paciente N° 20.584. Subdepartamento de Derechos de las Personas Intendencia de Prestadores de Salud. 2016.
71. Schwass DR, Swain M V., Purton DG, Leichter JW. A system of calibrating microtomography for use in caries research. *Caries Res*. 2009;43(4):314–21.
72. F. Esquivel-Upshaw J, Hsu SM, Bohórquez AC, Abdulhameed N, Scheiffele GW, Kim M, et al. Novel methodology for measuring intraoral wear in enamel and dental restorative materials. *Clin Exp Dent Res*. 2020;6(6):677–85.
73. Angmar B, Carlström D, Glas JE. Studies on the ultrastructure of dental enamel. IV. The mineralization of normal human enamel. *J Ultrastructure Res*. 1963;8(1–2):12–23.
74. Dowker SEP, Elliott JC, Davis GR, Wassif HS. Longitudinal study of the three-dimensional development of subsurface enamel lesions during in vitro demineralisation. *Caries Res*. 2003;37(4):237–45.
75. Dowker SEP, Elliott JC, Davis GR, Wilson RM, Cloetens P. Three-dimensional study of human dental fissure enamel by synchrotron X-ray microtomography. *Eur J Oral Sci*. 2006;114(SUPPL. 1):353–9.

76. Cochrane NJ, Anderson P, Davis GR, Adams GG, Stacey MA, Reynolds EC. An x-ray microtomographic study of natural white-spot enamel lesions. *J Dent Res.* 2012;91(2):185–91.
77. Craig R, Peyton F. The micro-hardness of enamel and dentin, , 37:661-8. *J Dent Res.* 1958;37(D):661–8.
78. Elgamily H, Safwat E, Soliman Z, Salama H, El-Sayed H, Anwar M. Antibacterial and Remineralization Efficacy of Casein Phosphopeptide, Glycomacropeptide Nanocomplex, and Probiotics in Experimental Toothpastes: An in Vitro Comparative Study. *Eur J Dent.* 2019;13(3):391–8.
79. Schwendicke F, Dörfer C, Kneist S, Meyer-Lueckel H, Paris S. Cariogenic effects of probiotic lactobacillus rhamnosus GG in a dental biofilm model. *Caries Res.* 2014;48(3):186–92.
80. Koulourides T, Phantumvanit P, Munksgaard EC, Housch T. An intraoral model used for studies of fluoride incorporation in enamel. *J Oral Pathol Med.* 1974;3(4):185–96.
81. Sung Y-H, Kim H-Y, Son H-H, Chang J. How to design in situ studies: an evaluation of experimental protocols . *Restor Dent Endod.* 2014;39(3):164.
82. Fierro-Monti C, Aguayo-Saldías C, Lillo-Climent F, Riveros-Figueroa F, Dentistry P, Professor A. Role of probiotics as bacteriotherapy in dentistry: a literature review. *Odontoestomatología* 2017;29(30):4–13.
83. Flichy-Fernández AJ, Alegre-Domingo T, Peñarrocha-Oltra D, Peñarrocha-Diago M. Probiotic treatment in the oral cavity: An update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010;15(5):677–80.
84. Comelli EM, Guggenheim B, Stingele F, Neeser JR. Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health. *Eur J Oral Sci.* 2002;110(3):218–24.
85. Vilaplana i Batalla M. Probióticos y salud. *Farm Prof [Internet].* 2015 May 1 [cited 2022 Nov 15];29(3):36–9.
86. Williams NT. Probiotics, clinical review. *Am J Heal Pharm.* 2010;67(6):449–58.
87. Capurso L. Thirty Years of Lactobacillus rhamnosus GG A Review. Vol. 53, *Journal of Clinical Gastroenterology.* 2019. 1–41 p.
88. Segers ME, Lebeer S. Towards a better understanding of Lactobacillus rhamnosus GG - host interactions. *Microb Cell Fact.* 2014;13(Suppl 1):S7.
89. Molina-Tijeras JA, Gálvez J, Rodríguez-Cabezas ME. The immunomodulatory properties of extracellular vesicles derived from probiotics: A novel approach for the

management of gastrointestinal diseases. *Nutrients*. 2019;11(5).

90. Carracedo J, Corpas I, Alique M, Ramírez-Carracedo R, Ramírez R. Role of microvesicles as biomarkers and future pharmacology targets of cardiovascular diseases. *An la Real Acad Nac Farm*. 2018;84(1):4–15.
91. Rubio APD, Martínez JH, Casillas DCM, Leskow FC, Piuri M, Pérez OE. *Lactobacillus casei* BL23 produces microvesicles carrying proteins that have been associated with its probiotic effect. *Front Microbiol*. 2017;8(SEP):1–12.
92. Stentz R, Carvalho AL, Jones EJ, Carding SR. Fantastic voyage: The journey of intestinal microbiota-derived microvesicles through the body. *Biochem Soc Trans*. 2018;46(5):1021–7.
93. Camelo-Castillo A, Benítez-Páez A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Mira A. *Streptococcus dentisani* sp. nov., a novel member of the mitis group. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014;64(PART 1):60–5.
94. López-López A, Camelo-Castillo A, Ferrer MD, Simon-Soro áurea, Mira A. Health-associated niche inhabitants as oral probiotics: The case of *Streptococcus dentisani*. *Front Microbiol*. 2017;8(MAR):1–12.

## Anexos

### **Anexo 1:** Protocolo por seguir de los voluntarios, Evaluación de cumplimiento y Evaluación de cumplimiento final

#### **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).

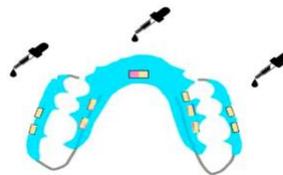


Figura 1: Dispositivo intraoral

- 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, 30 minutos 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 fluorada. 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 inducida):**

#### 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:**

- Al levantarse por la mañana debe preparar la solución de probiótico: tome 1 de los frascos pequeños, el cual contiene una porción de probióticos liofilizados y mézclelo con 10 ml de agua potable. Agite bien el frasco. Esta solución debe guardarla en el bolso pues deberá aplicarla 2 horas después de haberla preparado.

#### **Paso 3:**

- 2 horas después de la primera aplicación de sacarosa, nuevamente debe retirar el dispositivo de la boca y proceder a aplicar la solución preparada al comienzo del día en el frasco de probiótico. Debe aplicar 1 gota de probiótico en cada una de las muestras.

#### **Paso 4:**

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

#### **Paso 5:**

- 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.

### **Protocolo de intervención probiótico vía sistémica:**

#### Paso 1:

- En la mañana debe preparar la dosis de probiótico: tome 1 de los sobres, el cual contiene una porción de probióticos liofilizados y mézclela con 150 ml de agua potable en el frasco grande que se le ha entregado. Agite bien y conserve. Debe guardar esta preparación en el bolso debido que deberá ingerirla 2 horas después de haberla realizado.

#### Paso 2:

- Inmediatamente después de preparar el probiótico, debe realizar la primera aplicación de sacarosa que se encuentra contenida en el frasco pequeño: una vez retirado el dispositivo de la boca, debe aplicar 1 gota de sacarosa en cada bloque de esmalte. Inmediatamente luego de aplicar la gota de sacarosa, debe volver a colocar el dispositivo dentro de la boca.

#### Paso 3:

- 2 horas después de la primera aplicación de sacarosa, nuevamente debe retirar el dispositivo de la boca y proceder a ingerir la preparación realizada al comienzo del día en el frasco para probiótico.

#### Paso 4:

- Luego de la ingestión del probiótico en el paso 3, enjuagar vigorosamente la boca con agua y aplicar inmediatamente 1 gota de sacarosa en todos los bloques de esmalte. Luego de aplicar la gota de sacarosa, debe volver a colocar el dispositivo dentro de la boca.

#### Paso 5:

- Debe continuar aplicando 1 gota de sacarosa en todos los bloques de esmalte 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 volver a colocarse el dispositivo en el interior de la boca.

### **Protocolo de intervención probiótico vía sistémica y tópica:**

#### Paso 1:

- Al levantarse por la mañana debe preparar dos dosis de probiótico:
  - Tome 1 de los sobres, el cual contiene una porción de probióticos liofilizados y mézclela con 150 ml de agua potable en el frasco grande que se le ha entregado. Agite bien y conserve. Debe guardar esta preparación en el bolso.
  - Tome uno de los frascos pequeños, el cual contiene una porción de probióticos liofilizados y mézclelo con 10 ml de agua potable. Agite bien el frasco. Esta solución debe guardarla en el bolso pues deberá usarla 2 horas después.

#### Paso 2:

- Inmediatamente después de preparar el probiótico, debe realizar la primera aplicación de sacarosa que se encuentra contenida en el frasco pequeño: una vez retirado el dispositivo de la boca, debe aplicar 1 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.

#### Paso 3:

- 2 horas después de la primera aplicación de sacarosa, nuevamente debe retirar el dispositivo de la boca y utilizar las dos dosis de probiótico de la siguiente manera:
  - 1. Debe ingerir la preparación realizada al comienzo del día en el frasco para probiótico (frasco grande).
  - 2. Aplicar la otra solución preparada al comienzo del día en el frasco de probiótico (frasco chico). Debe aplicar 1 gota de probiótico en cada bloque de esmalte.

#### Paso 4:

- Luego del paso 3, aplicar inmediatamente 1 gota de sacarosa en todos los bloques de esmalte e introduce nuevamente el dispositivo dentro de la boca.

#### Paso 5:

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

**Anexo 2:** Evaluación de cumplimiento.

Se realizó un seguimiento diario de los voluntarios durante la primera y segunda fase de estudio, con el fin de tener un registro confiable de las aplicaciones de los voluntarios.

<b>Primera fase (voluntaria 1)</b>								
Día	Aplicación de Sacarosa primera fase							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	10:00	12:00	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	00:00
2	09:00	11:00	13:00	15:30	17:00	19:00	21:00	23:00
3	10:00	12:00	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	no aplica
4	12:00	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	24:00	02:00
5	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	24:00	02:00	no aplica
6	10:00	12:00	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	no aplica
7	09:00	11:00	13:00	15:00	17:00	19:00	21:00	23:00
8	10:00	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	00:00	02:00
9	10:00	12:00	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	00:00
10	10:00	12:00	14:00	16:00	no aplica	no aplica	09:00	11:00
11	10:00	12:00	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	00:00
12	09:30	11:30	13:00	15:00	17:00	19:00	no aplica	22:30
13	09:45	12:00	14:00	16:00	18:30	21:00	23:00	01:30
14	10:00	12:00	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	no aplica

**Segunda fase voluntaria 1)**

Aplicación de Sacarosa									
Día	1	2		3	4	5	6	7	8
		probiótico	Sacarosa						
1	09:00	X	11:00	13:00	17:00	19:00	21:00	11:00	01:00
2	10:30	X	12:30	15:00	18:00	20:00	22:00	24:00	02:00
3	08:00	X	10:00	12:30	02:30	17:00	19:00	21:00	23:00
4	08:00	X	11:00	12:00	14:00	17:00	07:30	09:30	23:00
5	08:00	X	11:00	13:00	15:00	17:00	07:30	09:30	23:00
6	11:00	X	12:30	02:30	17:00	19:00	21:00	11:00	
7	08:00	X	10:00	12:30	02:30	17:00	19:00	21:00	23:00
8	10:00	X	12:00	14:00	16:00	19:00	21:00	11:00	01:00
9	09:00	X	11:00	13:00	17:00	19:00	21:00	11:00	01:00
10	10:00	X	12:00	14:00	16:00	19:00	21:00	11:00	
11	10:00	X	12:00	14:00	16:00	19:00	21:00	11:00	
12	08:00	X	10:00	12:30	02:30	17:00	19:00	21:00	
13	10:00	X	12:00	14:00	16:00	19:00	21:00	11:00	01:00
14	08:00	X	10:00	12:30	02:30	17:00	19:00	21:00	

### Evaluación de cumplimiento final

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.

1. Cumplió con todas las aplicaciones: Si \_\_\_\_ No \_\_\_\_
2. Las aplicaciones de sacarosa fueron cada 2 horas: Si \_\_\_\_ No \_\_\_\_
3. 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		

4. Notifique las dificultades que tuvo durante el periodo experimental.

**Anexo 3:** consentimiento informado

**Universidad de Chile**  
**Facultad de odontología**

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

**Título del protocolo:** “Efecto del *Lacticaseibacillus rhamnosus* SP1 en la progresión de caries en un modelo *in situ*”.

**Investigadores responsables:** Dr. Rodrigo Cabello, Dr. Gonzalo Rodríguez, Od. Daniela Tobar.

**Sede de Estudio:** Facultad de Odontología, Universidad de Chile -Sergio Livingstone 943 – Independencia; Santiago

**Nombre del Participante:** \_\_\_\_\_

Este documento de Consentimiento informado se aplicará a Adultos y consta de dos partes:

- Información (proporcionar información sobre el estudio para usted)
- Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar)

Ud. Recibirá una copia completa del Documento de Consentimiento Informado.

Este proyecto está conformado por un equipo de investigadores de la facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Como investigadores principales Dr. Rodrigo Cabello, Od. Daniela Tobar, Dr. Gonzalo Rodríguez M y Dr. Mario Díaz. Estamos realizando una investigación cuyo objetivo “Determinar el efecto del *Lacticaseibacillus rhamnosus* SP1 en la disminución de la progresión de caries en las muestras de esmalte con lesiones de caries inducidas, en modelos *in situ*, expuestos por vía sistémica, tópica y mixta.” Para ello, se invitará a participar voluntarios de entre 18-30 años.

Le proporcionaremos información y lo invitaremos a ser parte de este proyecto. Antes de tomar su decisión puede hablar acerca de la investigación con cualquier personal de su confianza.

Este proceso se conoce como “Consentimiento Informado” y puede que contenga términos que usted no comprenda, por lo que siéntase con la absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude aclarar sus dudas al respecto.

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

**Justificación de a investigación:**

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

**Objetivo de la investigación:**

La presente investigación tiene como objetivo: “Determinar el efecto del *Lactocaseibacillus rhamnosus* SP1 en la disminución de la progresión en muestras de esmalte con lesiones de caries inducidas, en modelos *in situ*, expuestos por vía sistémica, tópica y mixta.”

**Beneficios de la investigación:**

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

**Tipo de intervención y procedimiento:**

Si usted decide participar se realizará una evaluación clínica a los participantes, para conocer su cumplen con los criterios de exclusión e inclusión, posteriormente se tomará impresiones de su boca para poder confeccionar un dispositivo intraoral. Este dispositivo es una placa acrílica, que contendrán 10 bloques de esmalte de dientes humanos estériles.

El estudio tiene dos fases de 28 días de duración, en la primera fase del estudio tendrá una duración de 14 días en el cual se inducirá una lesión inducida de caries *in situ*, mediante la aplicación de una gota de sacarosa al 20% m/v, la cual será cada 2 horas con un total de 8 aplicaciones al día, finalizando a la primera fase se esterilizará los bloques de esmalte y se dividirán en 4 los siguientes grupos de estudio:

A: Grupo expuesto a probiótico tópico-sacarosa; Se aplicará a todos los bloques de esmalte 1 gota de 20% m/v de sacarosa, cada 2h mediante un gotario fuera de la cavidad oral y una dosis diaria (1 gota) de probiótico *Lactocaseibacillus rhamnosus cepa* SP1 en todos los bloques, el cual deberá prepararlo dos horas antes de su aplicación.

B: Grupo expuesto a probiótico sistémico-sacarosa; Deben retirar el dispositivo intraoral y aplicar una gota de sacarosa al 20% en todos los bloques de esmalte, cada 2h hasta obtener 8 aplicaciones diarias e ingerir 150ml de agua en la que deberá suspender una dosis de  $10^8$  UFC/mL de *Lactocaseibacillus rhamnosus* SP1 dos horas antes de la ingesta, luego deberá enjuagarse la boca antes de introducir el dispositivo.

C: Grupo expuesto a probiótico mixto-sacarosa; Deben retirar el dispositivo intraoral y aplicar una gota de sacarosa al 20% m/v en todos los bloques de esmalte, cada 2h hasta obtener 8 aplicaciones diarias e ingerir 150ml de agua en la que se suspenderá una dosis de  $10^8$  UFC/mL de *Lactocaseibacillus s rhamnosus* SP1, además, debe colocar una 1 gota (0,083 uml) de probiótico en todos los bloques de esmalte. Los probióticos deberán ser preparados 2 horas antes de su ingesta y aplicación.

D: Grupo control positivo y negativo; el control negativo serán todos los bloques de esmalte encontrados en la parte palatina anterior, los cuales van a ser revestidos con esmalte de uñas, en cuanto al grupo control positivo, este consta de la aplicación de una 1 gota de 20% de sacarosa, cada 2h mediante un gotario fuera de la cavidad oral.

Un dato importante para recordar es que las placas solo se removerán para comer y para lavarse los dientes y serán utilizadas por 28 días. Además, se le entregará un protocolo completo en el cual se indica paso a paso el uso de probióticos y sacarosa en el estudio.

### **Riesgo de la investigación:**

Este protocolo es mínimamente invasivo, la utilización del aparato es inocuo para su salud y la toma de muestras no produce ningún daño. Además, su participación en este estudio no tiene costo económico para usted. En caso de presentar algún tipo de molestia o incomodidad póngase en contacto con los investigadores del proyecto.

**Criterios para selección de los participantes en del estudio:**

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

En cuanto a los criterios de exclusión serán; individuos que estén o hayan estado con tratamiento de antibióticos, probióticos o antisépticos en los últimos 6 meses previos, además, no podrán participar en el estudio personas con alteraciones del flujo salival, portadores de prótesis o dispositivos intraorales, edéntulos, mujeres embarazadas y fumadores.

**Confidencialidad y difusión de datos:**

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

**Aclaraciones:**

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

### Carta de Consentimiento Informado

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

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



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

Nombre del Paciente: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

#### Sección a llenar por el Investigador Principal

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



Nombre del Investigador Principal: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

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

Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

## Anexo 4: consentimiento de donantes 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 descritos, los dientes serán destruidos y eliminados siguiendo los protocolos de bioseguridad.

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

#### Criterios para selección de los participantes en el estudio

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



**Confidencialidad y difusión de datos.**

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

**Aclaraciones**

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

**Carta de Consentimiento Informado**

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

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

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

	Firma	Fecha
--	-------	-------

**Sección a llenar por el Investigador Principal**

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

Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez (Investigador Principal)

	Firma	Fecha
--	-------	-------



## Anexo 5: Acta de aprobación de protocolo



Ed-24 Agosto 2017

### **ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN**

---

INFORME N°:2016/30

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

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

**Dr. Eduardo Fernández**  
Presidente CEC

**Dr. Marco Cornejo**  
Vicepresidente CEC

**Dra. Weronika Weil**  
Miembro Permanente CEC

**Sra. Paulina Navarrete**  
Miembro Permanente CEC

**Sr. Roberto La Rosa**  
Miembro Permanente CEC

**Dr. Rodrigo Cabello**  
Miembro Permanente CEC

**Dr. Alfredo Molina**  
Miembro Permanente CEC

**Dra. Paola Llanos**  
Miembro Permanente CEC

**Dr. Juan Estay**  
Miembro Permanente CEC

**Sra. Rebeca Galarce**  
Representante de la Comunidad

**Dra. Viviana Toro**  
Miembro Alterno CEC

**2. Fecha de Aprobación: 03/05/2017**

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

**3. Investigador responsable: Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez**

**4. Institución Patrocinante: Facultad de Odontología – Universidad de Chile**

**5. Documentación Revisada:**

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

**6. Fundamentación de la aprobación**

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

**RESPECTO A ASPECTOS METODOLÓGICOS:**

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

**RESPECTO A ASPECTOS JURIDICOS:**

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

RESPECTO A ASPECTOS ÉTICOS:

Realizar las siguientes modificaciones al C.I.:

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

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



**Dr. Eduardo Fernández G.**  
**Presidente CEC**



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