



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA RESTAURADORA

ÁREA DE CARIOLOGÍA

**“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”**

Joaquín Eduardo Aliaga Ortega

Trabajo de Investigación
Requisito para optar el título de
Cirujano-Dentista

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Rodrigo Cabello Ibacache

TUTORES ASOCIADOS
Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez
Dr. Mario Diaz Dosque

Adscrito a Proyecto FIOUCH 17/015
Santiago-Chile 2020



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA RESTAURADORA

ÁREA DE CARIOLOGÍA

**“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”**

Joaquín Eduardo Aliaga Ortega

Trabajo de Investigación

Requisito para optar el título de

Cirujano-Dentista

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Rodrigo Cabello Ibacache

TUTORES ASOCIADOS
Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez
Dr. Mario Díaz Dosque

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, sin el apoyo incondicional de ellos, no podría estar donde estoy ahora, desde muy temprana edad me motivaron, enseñaron, guiaron para ser mejor persona y ahora mejor profesional, todos mis logros los debo a ellos.

A mi novia, Katherine Rivera Godoy, que a pesar que llegó a mi vida hace un poco de un más de un año, estoy muy agradecido por todo el apoyo, motivación y amor que me entrega a diario, estando conmigo en una etapa muy linda de mi vida, me enseñaste lo que es el esfuerzo y la perseverancia, tú que estas logrando todas la metas que te estas proponiendo, estaré por siempre agradecido.

Al Dr. Rodrigo Cabello y Dra. Daniela Tobar por el apoyo y paciencia durante todo el proceso de la tesis.

A mis amigos de la universidad, por todos estos años de amistad incondicional, en los buenos y malos momentos, amigos que quedan para toda la vida.

Y por último a las personas que ya no están pero que estuvieron durante mi proceso de formación universitaria.

Declaración

El presente trabajo de investigación fue realizado con la colaboración de la estudiante de Magister en Ciencias Odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile; Dra. Daniela Susana Tobar Almache, y los alumnos de pregrado de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile; Sophya Consuelo Muñoz Ruiz y Javier Alonso Naveillán Paulsen, bajo la tutela del profesor guía, Dr. Rodrigo Cabello Ibacache. Dentro de los resultados del mismo, existen datos que son compartidos con los Trabajos de Investigación titulados: "Efecto del *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG en la progresión de caries en un modelo *in situ*"; "Efecto en la progresión de lesiones de caries en esmalte en un modelo *in situ*, mediante el uso de probióticos de manera sistémica" y "Efecto del probiótico *Lacticaseibacillus rhamnosus* SP1 de manera tópica, en la progresión de lesiones de caries de esmalte, 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 ésta y las demás investigaciones.

Índice

I.	Resumen.....	Pg. 8
II.	Marco teórico	
	2.1 Introducción.....	Pg. 10
	2.2 Caries dental con enfoque ecológico.....	Pg. 11
	2.3 Esmalte dental.....	Pg. 12
	2.4 Proceso de desmineralización y remineralización.....	Pg. 13
	2.5 Probióticos.....	Pg. 15
	2.6 Modelo <i>in situ</i> de caries.....	Pg. 17
	2.7 Planteamiento del problema.....	Pg. 17
III.	Hipótesis.....	Pg. 19
IV.	Objetivo general.....	Pg. 19
V.	Objetivos específicos.....	Pg. 19
VI.	Materiales y métodos	
	6.1 Tipo de estudio.....	Pg. 20
	6.2 Muestra.....	Pg. 20
	6.3 Consideraciones éticas.....	Pg. 21
	6.4 Preparación de los bloques de muestras de esmalte humano.....	Pg. 22
	6.5 Selección voluntarios y preparación de aparatos.....	Pg. 23
	6.6 Desarrollo estandarizado de lesiones de caries.....	Pg. 25
	6.7 Modelo experimental.....	Pg. 26
	6.8 Intervención.....	Pg. 26
	6.9 Variables.....	Pg. 27
	6.10 Medición de los resultados.....	Pg. 28
	6.11 Plan de análisis de datos.....	Pg. 30
VII.	Resultados	
	7.1 Densidad mineral.....	Pg. 31
	7.2 Microdureza de Vickers.....	Pg. 35
VIII.	Discusión.....	Pg. 36
IX.	Conclusión.....	Pg. 41

X.	Referencias bibliográficas.....	Pg. 42
XI.	Anexos.....	Pg. 47

I. Resumen

La caries dental es una de las enfermedades crónicas más prevalentes de las personas en todo el mundo; las personas son susceptibles a esta enfermedad a lo largo de su vida. La caries dental se forma a través de una interacción compleja a lo largo del tiempo entre las bacterias productoras de ácido y los carbohidratos fermentables, y varios factores del hospedero, incluidos los dientes y la saliva. El riesgo de caries incluye factores físicos, biológicos, ambientales, conductuales y relacionados con el estilo de vida, como un alto número de bacterias cariogénicas, flujo salival inadecuado, exposición insuficiente al flúor, mala higiene bucal, métodos inadecuados de alimentación infantil y pobreza. La prevención y el tratamiento secundarios deben centrarse en el manejo del proceso de caries a lo largo del tiempo para pacientes individuales, con un enfoque mínimamente invasivo que preserve el tejido. Actualmente, se están estudiando los probióticos los cuales son microorganismos vivos que cuando se administran en dosis adecuadas confieren un beneficio para la salud del hospedero, según la OMS estos han demostrado que pueden tener un papel fundamental en la cavidad oral y en la prevención de la enfermedad de caries. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del uso sistémico y tópico del probiótico *Lacticaseibacillus rhamnosus* SP1 sobre la progresión de lesiones de caries en esmalte en un modelo *in situ* en la cavidad oral. Un total de 4 participantes sanos, sin enfermedad de caries ni enfermedad periodontal, fueron portadores de un aparato acrílico intra oral, localizado en la arcada superior, este dispositivo presentaba 10 ranuras en las que se insertaron los bloques de esmalte, previamente obtenidos de terceros molares incluidos, a los cuales se les determinó previamente su densidad mineral con Micro-CT. Los 4 participantes se dividieron en dos grupos, estudio y control. El estudio contaba con 2 fases experimentales, la primera, con una duración de 14 días, el desafío cariogénico, el cual consistía en que cada participante debía instilar 1 gota de sacarosa al 20% cada 2 horas, 8 veces al día en cada bloque de esmalte. Una vez cumplidos los 14 días, los bloques fueron recolectados y medidos con micro-CT para luego ser nuevamente aleatorizados y distribuidos en los dispositivos. La segunda fase de experimentación, con una duración de 14 días, los dos participantes del grupo estudio usaron el dispositivo

intraoral manteniendo el desafío cariogénico e instilaron una solución del probiótico *L. rhamnosus* SP1 de manera sistémica y tópica, junto a la segunda aplicación de sacarosa y el grupo control solamente continuó con el desafío cariogénico por 14 días. Una vez finalizada la fase dos, se volvieron a recopilar los bloques de esmalte, y se volvió a medir su densidad mineral con micro-CT y microdureza superficial. Las mediciones de densidad mineral en las 3 ocasiones dieron los siguientes resultados, inicialmente para el grupo experimental de obtuvo un valor promedio de $2,90 \pm 0,13$ gr/cm³ y $2,81 \pm 0,05$ gr/cm³ para el grupo control, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Luego de la primera fase, tanto el grupo estudio como control disminuyeron sus densidades minerales promedios, $2,38 \pm 0,14$ gr/cm³ y $2,38 \pm 0,13$ gr/cm³, respectivamente, sin diferencias estadísticamente significativas. Una vez finalizada de la fase dos experimental, se mostraron diferencias significativas entre el grupo estudio, expuesto a sacarosa y probiótico ($2,12 \pm 0,10$ gr/cm³), y el grupo control, expuesto solo a sacarosa ($2,05 \pm 0,14$ gr/cm³). Respecto a la microdureza superficial ambos grupos presentaron diferencias estadísticamente significativas en sus promedios. El valor del grupo estudio ($260,50 \pm 28,27$) luego de la fase dos fue mayor con comparación con el grupo control ($180,60 \pm 59,65$). Se puede concluir que la exposición al probiótico *L. rhamnosus* SP1 de forma mixta demostró un efecto benéfico/atenuante frente a los fenómenos de desmineralización en bloques de esmalte cariados en un modelo de caries *in situ*, confirmado a través de mediciones de densidad mineral y microdureza superficial.

II. Marco Teórico

2.1 Introducción

La enfermedad de caries es la más prevalente en el mundo y está demostrado que es la principal causa de la pérdida dentaria provocando un efecto en la calidad de vida y sus diferentes dimensiones, como hablar, comer, la apariencia y en las relaciones sociales (Luoto y cols., 2009). Esta alta prevalencia también significa que el costo financiero mundial para tratarla es elevado (Robinson y cols., 2000). Es una enfermedad crónica no transmisible, progresiva y multifactorial, modificada por factores patogénicos o protectores, está mediada por biopelículas y es un proceso dinámicamente alternado de desmineralización y remineralización (Wang y cols., 2016; Wong y cols., 2017).

La caries de la primera infancia es un problema de salud pública frecuente en los países en desarrollo y todavía representa una carga significativa para los servicios de salud en todo el mundo. Los datos nacionales han mostrado lo siguiente; una prevalencia del 17% en niños de 2 años, una prevalencia de 48% a los 4 años y del 70% en niños de 6 años según los criterios de la Organización Mundial de la Salud (MINSAL, 2010).

La terapia con probióticos para prevenir y controlar las enfermedades bucales ha crecido notablemente en los últimos años. El pensamiento conceptual es que una cepa efectora inofensiva se implanta en la microbiota del hospedero para mantener o restaurar un microbioma natural mediante la interferencia y / o inhibición de otros microorganismos, y especialmente patógenos. Además, se cree que una modulación sistémica de parámetros inmunológicos es parte de la interacción. Si la interferencia bacteriana o la bacterioterapia se aplican a la caries dental sigue siendo una cuestión abierta. Las evaluaciones clínicas de probióticos que son específicos de la cavidad bucal son poco frecuentes (Twetman y Keller, 2012).

Un estudio realizado por Rodríguez y cols. (2016) con el objetivo de ver el efecto de leche suplementada con *L. rhamnosus* SP1 en la ocurrencia de caries en niños con alto riesgo cariogénico, obtuvo como resultado una disminución de ésta en el grupo estudio. También el probiótico *L. rhamnosus* SP1 mostró un rápido aclaramiento en la boca cuando se detiene la ingesta de éste, por lo tanto, se sugiere una ingesta

diaria con el fin de lograr una disminución de la incidencia de la caries. Entre las conclusiones de este estudio es necesario clarificar los mecanismos de acción de los probióticos dentro de la cavidad bucal.

El objetivo de este trabajo de investigación clínico es ver el efecto del uso del probiótico *L. rhamnosus* SP1 de forma sistémica y tópica en la progresión en lesiones de caries de esmalte en un modelo *in situ* en la cavidad oral.

2.2 Caries dental con enfoque ecológico

El término caries dental se utiliza para describir los signos y síntomas, de una disolución química localizada en la superficie del diente causada por eventos metabólicos que tienen lugar en el microbiota supragingival que cubre el área afectada. La destrucción puede afectar el esmalte, la dentina o el cemento y permanece durante un período de tiempo (Fejerskov y Kidd, 2013). Una vez establecida, la microbiota tiene una composición diversa, que consiste en una amplia variedad de especies bacterianas Gram-positivo y -negativo, levaduras y otros tipos de microorganismos los cuales cambian su composición a medida que la ecología de la boca se altera. Los microorganismos orales residentes están adaptados para utilizar nutrientes endógenos para el crecimiento tales como, proteínas salivales y glicoproteínas, pero sobrepuestos a esto pueden existir ingestas repentinas e irregulares de carbohidratos en la dieta en exceso como los azúcares fácilmente fermentables —glucosa, fructosa y sacarosa. No obstante, la boca es aeróbica, las bacterias anaerobias estrictas y las anaerobias facultativas pueden persistir dentro de la microbiota comprendiendo un grupo más numeroso de bacterias en estos sitios. Los organismos tienen que adherirse firmemente a una superficie para evitar ser arrastrados por el flujo de saliva o deglutidos. Por lo tanto, la mayoría de los organismos se encuentran en sitios de difícil acceso para su eliminación a través de la saliva alrededor de la dentición (Fejerskov y Kidd, 2013).

La hipótesis ecológica de la placa propone que los organismos asociados con la enfermedad, llamados patobiontes, están presentes en sitios sanos y en niveles bajos en condiciones de salud. La enfermedad es el resultado de una disbiosis impulsada por un cambio en las condiciones ambientales locales, en el caso de la caries dental,

la disminución del pH después de la ingesta frecuente de azúcar o la disminución del *clearance* de azúcar después de la baja secreción salival favorecerán el crecimiento de especies acidógenas y acidúricas (Fejerskov y Kidd, 2013). Está estudiado que existen diferencias sustanciales en la composición de la microbiota que recubre las lesiones de caries, con un enriquecimiento de las especies con un fenotipo acidogénico y tolerante a los ácidos. La cariogenicidad de las bacterias asociadas con las caries dentales se relaciona con su capacidad para convertir rápidamente los azúcares de la dieta en ácidos orgánicos, reducir el pH, desmineralizar la estructura dental y continuar proliferando y metabolizando los azúcares bajo estas condiciones ácidas. Por el contrario, muchas de las bacterias residentes beneficiosas para el hospedero crecen preferentemente a pH neutro y no pueden crecer en condiciones ácidas. El control de la caries, como enfermedad multifactorial, requiere un enfoque holístico de control mecánico efectivo de la microbiota y modificación de la dieta (Marsh, 2018).

2.3 Esmalte dental

El esmalte es un tejido acelular compuesto por 80-90% en volumen de cristales de hidroxiapatita de calcio carbonatado. El 10-20% restante consiste en material fluido y orgánico, generalmente proteico. La distribución de estos componentes no es homogénea, en su mayor parte relacionada con la micro morfología específica. Los cristales de apatita son largos (posiblemente hasta 1 μm), 50 nm de ancho y 25 nm de espesor, que se extiende desde la dentina hacia la superficie del esmalte. La hidroxiapatita tiene una dureza de aproximadamente 430 KHN (dureza de Knoop) y el esmalte 370 KHN; sin embargo, esto no solo refleja la dureza de la hidroxiapatita, sino que también está relacionada con la fuerza con que los cristales individuales se adhieren entre sí. Están dispuestos en grupos de aproximadamente 1000 cristales, en los denominados prismas de esmalte. Los espacios intercristalinos forman una fina red de vías de difusión que a menudo se denominan microporos. Los cristales de hidroxiapatita se disponen principalmente con sus ejes largos (c-) paralelos a los ejes largos de los prismas. En la periferia de cada prisma, los cristales se desvían un poco de esta orientación, produciendo una interfaz entre prismas donde puede existir más espacio intercristalino formando una fina red de vías de difusión en el esmalte. Todos

los espacios dentro del esmalte, independientemente de su tamaño, contendrán proteínas, lípidos y agua. La presencia de este componente orgánico modificará naturalmente los procesos de difusión dentro y fuera del esmalte, así como también modificará la reacción de la fase mineral a los factores ambientales en la cavidad oral. Por lo tanto, es razonable considerar el esmalte dental, incluida la micro superficie externa, como un sólido microporoso compuesto de cristales apretados (Robinson y cols., 2000; Fejerskov y Kidd, 2013).

La estructura estequiométrica se aprecia más fácilmente considerando la disposición de iones alrededor de la columna central de hidroxilo, que se extiende en la dirección del eje C a través de los ejes largos de los cristales, pero la apatita en el esmalte y en todos los demás tejidos mineralizados, presenta una serie de variaciones sobre este tema. Dichas variaciones incluyen iones faltantes, particularmente calcio e hidroxilo. También se pueden encontrar con frecuencia iones como carbonato, fluoruro, sodio y magnesio dentro de la estructura cristalina. Tales defectos y sustituciones tienen un profundo efecto sobre el comportamiento de la apatita, especialmente con respecto a su solubilidad. Se ha informado que el producto de solubilidad para el mineral de esmalte es más alto que el calculado para la apatita estequiométrica. La caries del esmalte en particular puede considerarse casi exclusivamente como un proceso químico que, dado que el esmalte es totalmente acelular, puede considerarse que se produce sin la participación de células del hospedero. Como resultado de esto, muchas de las estrategias preventivas y reparadoras pueden autoactivarse a través de cambios en el entorno químico local. El ataque ácido sobre el diente es episódico, con episodios destructivos que ocurren más o menos continuamente. Por lo tanto, se necesitan medidas reparadoras constantemente, es decir, el entorno debe ser monitoreado y ajustado continuamente para mantener el proceso de remineralización (Robinson y cols., 2000).

2.4 Proceso de desmineralización y remineralización

Los carbohidratos fermentables son metabolizados por las bacterias del *biofilm* que producen ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico. Estos productos finales del

metabolismo bacteriano se acumulan en la fase fluida de la biopelícula, lo que provoca una caída del pH y la desmineralización de la capa superficial del diente (Zero, 1999).

Ocurre un aumento en la porosidad del esmalte, los espacios entre los cristales quedan ensanchados y la superficie se ablanda, lo que brinda una oportunidad para que los ácidos penetren más profundamente en la estructura dental y se desmineralice (Pitts y cols., 2017).

En este punto, los productos de reacción de la desmineralización (calcio y fosfato) se acumulan en la superficie del esmalte y pueden protegerlo de una mayor pérdida de minerales. Además, el fluoruro disponible puede ayudar a proteger contra la desmineralización de la superficie (Pitts y cols., 2017; Cate Ten y cols., 1991).

Los azúcares son tragados y eliminados por la saliva, ésta puede devolver el pH del *biofilm* a la neutralidad gracias a su capacidad amortiguadora; el calcio, el fosfato y el fluoruro ahora remineralizan la superficie del diente (Pitts y cols., 2017).

Si las condiciones ácidas se perpetúan, las caídas de pH continuarán llegando a un punto en el que la tasa de pérdida de minerales bajo la superficie sea mayor que en la superficie, lo que dará como resultado una lesión bajo ésta. Cuando hay suficiente pérdida de minerales, una mancha blanca se vuelve clínicamente visible (Pitts y cols., 2017).

Una mancha blanca se puede detener o revertir si se implementan cambios de hábitos como el alimenticio y medidas preventivas como el uso diario de pasta fluorada. Si la caries progresa más, se forman microcavidades en el esmalte debido al aumento de la porosidad de la superficie, lo que corresponde clínicamente a un código ICDAS 3. La lesión superficial colapsará con el tiempo, dejando un orificio macroscópico. A pesar de la gravedad de la lesión en este punto, aún se puede detener, pero la cavidad permanecerá (Pitts y cols., 2017).

2.5 Probióticos

De acuerdo con la OMS los probióticos son "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedero (FAO/WHO, 2002).

La aplicación potencial de probióticos incluye la prevención y el tratamiento de diversas afecciones y enfermedades tales como, infecciones gastrointestinales, enfermedad inflamatoria intestinal, intolerancia a la lactosa, alergias, infecciones urogenitales, fibrosis quística, varios cánceres, reducción de los efectos secundarios de los antibióticos, y en la salud bucal, como la prevención de caries dentales, enfermedades periodontales, mal olor bucal y muchos otros efectos que están bajo investigación (Singh y cols., 2013).

Se han propuesto varios mecanismos de acción de los probióticos, incluida una variedad de efectos locales y sistémicos combinados que implican adhesión, coagregación, inhibición competitiva, producción de ácidos orgánicos y compuestos similares a las bacteriocinas y modulación inmunitaria (Teughels y cols., 2008; Twetman y Keller, 2012).

Comelli y cols. (2002) describieron que, de las 23 cepas bacterianas utilizadas en la industria láctea, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus lactis* ssp. fueron las únicas con capacidad para integrarse en un *biofilm* presente en una superficie de hidroxiapatita e interferir con el desarrollo de la especie cariogénica *Streptococcus sobrinus*. Una revisión sistemática de diferentes cepas probióticas sugiere que el género *Lactobacillus* demuestran una evidencia más consistente de efectos terapéuticos para la prevención de nuevas caries y la reducción de éstas, que los géneros *Bifidobacterium* y *Streptococcus*. Los efectos preventivos y terapéuticos del género *Lactobacillus* pueden explicarse por una reducción en los recuentos orales de *S. mutans*, lo que eventualmente conduce a una disminución en la incidencia de caries (Coqueiro y cols., 2018).

Entre el género *Lacticaseibacillus*, *L. rhamnosus* SP1, también conocido como *L. rhamnosus* GG, se ha convertido en una de las bacterias probióticas más estudiadas del mundo con décadas de uso seguro que respalda su eficacia y sus beneficios para la salud (Vandenplas y cols., 2015; Banna y cols., 2017). En 2001, un estudio que incluyó a 594 niños, de 1 a 6 años, en el cual algunos recibieron leche normal y otros una leche suplementada con *L. rhamnosus*, 5 días a la semana en las guarderías durante 7 meses, determinó que la leche que contiene la bacteria probiótica *L. rhamnosus* GG tiene un efecto beneficioso sobre la salud dental de los niños, especialmente a la edad de 3 a 4 años (Näse y cols., 2001).

En la actualidad, Piwat y cols. (2020) demostraron que el uso de probióticos no solo puede prevenir lesiones de caries, sino que revertir el proceso de éstas. El estudio consistió en dividir a niños entre 1 a 5 años, en 3 grupos, uno que recibió diariamente la leche con probiótico, otro que recibió 3 veces a la semana leche con probiótico y el resto de los días placebo y por último un tercer grupo que recibió placebo. Hubo tres tiempos de medición, inicial, 6 meses y a los 12 meses. En conclusión, el consumo diario o trisemanal de leche probiótica con la cepa *L. paracasei* SD1 puede prevenir moderadamente nuevas caries, pero revertir considerablemente las lesiones cariosas, lo que sugiere que los intervalos de dosis diarios o trisemanales son suficientes para revertir las lesiones cariosas en niños pequeños.

El efecto local que tienen las bacterias probióticas cuando interactúan con otras bacterias en la biopelícula y dificultan el crecimiento de los patógenos, es mediante la producción de peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y ácidos orgánicos. Sin embargo, los mecanismos de acción no se conocen completamente y existen informes contradictorios sobre los efectos inducidos por los probióticos en la respuesta del entorno oral (Twetman y cols., 2017).

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

2.6 Modelo *in situ* de caries

Los modelos *in situ* se han estado utilizando en la odontología durante muchos años. La investigación de caries *in situ* sirve como puente entre la investigación clínica y los estudios de laboratorio. En este tipo de investigación, los voluntarios usan una férula o prótesis intraoral removible que contiene muestras de investigación. Gracias al diseño más flexible del experimento es posible incluir varios factores que se involucran en el proceso de formación de la caries, los cuales no es posible en los modelos *in vitro* (Zero, 1995; Hollanders y cols., 2018). Respecto a este experimento, debido a que la enfermedad de caries es un proceso multifactorial, éste debió incluir un sustrato dental (esmalte), presencia de una biopelícula con potencial cariogénico o formación de ésta, presencia de carbohidratos (sacarosa al 20%) y tiempo, este último determinado por el experimento y sus fases. Una de las principales ventajas de los modelos de caries *in situ* es que se sitúan en la cavidad oral y se pueden controlar algunas de las variables experimentales, mientras que su principal desventaja puede ser el poco número de voluntarios que se pueden usar durante el experimento debido a que se realiza en humanos y además depende en el compromiso de estos para su correcta ejecución (Zero, 1995).

2.7 Planteamiento del Problema

Las enfermedades bucales son las más comunes de las enfermedades crónicas y son un importante problema de Salud Pública por su alta prevalencia, impacto en los individuos y en la sociedad, y el costo de su tratamiento (Sheiham, 2005).

La caries dental es una de las enfermedades más prevalentes tanto en niños como en adultos en todo el mundo (Selwitz y cols., 2007). Sin embargo, el éxito de todos los programas de prevención de caries se ha visto obstaculizado por su naturaleza multifactorial. La enfermedad es el resultado de la desmineralización, causada por las interacciones de las bacterias cariogénicas, una dieta rica en carbohidratos fermentables y componentes del hospedero, como las propiedades de los dientes y la saliva (Fejerskov, 1997).

Hoy en día, la odontología contemporánea se basa en la odontología mínimamente invasiva, la cual se enfoca en la prevención y remineralización de las lesiones de caries en su etapa inicial. Es por esto que surge la necesidad de prevenir con mayor eficacia la ocurrencia de esta enfermedad y el uso de probióticos podría ser una opción terapéutica que complementa los tratamientos preventivos clásicos. Como se observó en los resultados del estudio de Piwat y cols. (2020), los probióticos administrados de forma trisemanal o diaria, pueden tener un efecto terapéutico sobre lesiones de caries ya establecidas, generando una reversión en éstas.

Dado lo anterior, este trabajo de investigación propone estudiar el efecto del probiótico *L. rhamnosus* SP1 de consumo mixto (sistémico y exposición tópica) en la disminución de la progresión de lesiones de caries, lo cual se realizará determinando la densidad mineral y dureza superficial en bloques de esmalte con una lesión de caries insertados en un modelo *in situ* de caries. La pregunta de investigación que se plantea es: ¿Existe un efecto benéfico/protector del probiótico *Lactocaseibacillus rhamnosus* SP1, administrado de forma mixta (sistémico y exposición tópica), sobre la progresión de lesiones de caries de esmalte en un modelo *in situ* de caries?

III. HIPÓTESIS.

El uso de *Lacticaseibacillus rhamnosus* SP1 de forma mixta (sistémico y exposición tópica) tendrá una disminución en la progresión en lesiones de caries de esmalte inducidas en un modelo *in situ* en la cavidad oral.

IV. OBJETIVO GENERAL.

Establecer el efecto del uso mixto del probiótico *Lacticaseibacillus rhamnosus* SP1 sobre la progresión de lesiones de caries en esmalte inducidas en un modelo *in situ* en la cavidad oral

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinar la progresión de lesiones de caries en esmalte (densidad mineral y dureza superficial) en un modelo *in situ* en la cavidad oral en un grupo de estudio al consumir el probiótico *Lacticaseibacillus rhamnosus* SP1 de forma mixta (sistémica y tópica).
2. Determinar la progresión de lesiones de caries en esmalte (densidad mineral y dureza superficial) en un modelo *in situ* en la cavidad oral en un grupo control sin consumir probióticos.
3. Comparar resultados del grupo de estudio y el grupo control, en sus valores de dureza superficial y densidad mineral en el modelo *in situ* en la cavidad oral.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Tipo de estudio:

El tipo de estudio que se realizó en esta investigación fue experimental *in situ*. Los modelos de caries *in situ* implican el uso de aparatos u otros dispositivos intraorales que crean condiciones definidas que simulan el proceso de caries dental, entonces en este trabajo se generaron lesiones de caries en 40 muestras de esmalte humano insertos en unos dispositivos intra orales removibles, que estuvieron en la boca de los sujetos, las cuales fueron sometidas mediante instilación, a sacarosa al 20%, 8 veces al día cada 2 horas, durante 14 días, para generar lesiones de caries artificiales. En la segunda fase del experimento con una duración de 14 días, los participantes del grupo experimental usaron el dispositivo intraoral manteniendo el desafío cariogénico e instilaron 1 gota del probiótico de manera tópica en cada bloque y además consumieron una solución de 150 mL de agua con 10^8 UFC/mL del probiótico *L. rhamnosus* SP1 de manera sistémica, junto a la segunda aplicación de sacarosa y el grupo control solamente continuó con el desafío cariogénico por 14 días. Finalmente, se determinó el efecto del probiótico *L. rhamnosus* SP1 en la progresión de la lesión de caries, mediante microdureza superficial (microindentador de Vickers) y densidad mineral (Micro-CT).

6.2 Muestra:

Los sujetos portadores de los aparatos intra orales fueron voluntarios de la facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

La muestra consiste en muestras de esmalte humano de terceros molares incluidos de personas intervenidas en el Instituto Nacional de Ortodoncia.

Para el cálculo del tamaño de muestra, se decidió que el tamaño de muestra que se ajusta mejor al modelo se lograba cuando se utilizaba la medición de microdureza superficial (Seguel, 2020). Se consideró un riesgo alfa de 0,05 y un riesgo beta de 0,2 en un contraste bilateral. Se asume una desviación estándar común de 15,3 (Colil Orellana, 2019), con una tasa de pérdidas de seguimiento del 5%, y un poder estadístico de 80%. Se necesitan 20 unidades de observación correspondientes a bloques de esmalte en cada grupo para detectar una diferencia igual o superior a 15

unidades de microdureza de Vickers. El número final de unidades de observación fueron de 40.

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

-Grupo A estudio: 20 muestras de esmalte que fueron divididas equitativamente en 2 sujetos voluntarios portadores del dispositivo intra oral, las cuales se sometieron a una solución de sacarosa y a una solución con el probiótico *L. rhamnosus* SP1 de forma mixta.

-Grupo B control: 20 muestras de esmalte que fueron divididas equitativamente en 2 sujetos voluntarios portadores del dispositivo intra oral, las cuales se sometieron a la solución de sacarosa.

6.3 Consideraciones éticas:

6.3.1 Donación del tercer molar

Se informó acerca del motivo del uso de sus dientes en el proyecto de investigación y una vez informado, los que quisieron donar, firmaron un consentimiento informado en el cual acepta el uso de estos para motivos de investigación (Anexo 4).

6.3.2 Sujetos portadores de dispositivo intra oral removible.

Se obtuvo el consentimiento informado de cada sujeto antes de la participación en la investigación en el cual se expliquen los objetivos, importancia, relevancia, procedimientos por realizar y posibles complicaciones del proyecto (Anexo 2).

Los sujetos fueron voluntarios y participantes informados del proyecto de investigación, los cuales fueron seleccionados a través de métodos de inclusión y exclusión mostrados en el punto 6.5.

Todo el protocolo del proyecto de investigación fue presentado al Comité de Ética Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile previo al inicio de este (Anexo 3).

Todo el proceso cumplió con los cuatro principios básicos de la bioética: autonomía, no maleficencia, beneficencia y justicia.

6.4 Preparación de los bloques de muestras de esmalte humano

Primero se obtuvieron los dientes del Instituto Nacional de Ortodoncia, estos son terceros molares incluidos que no han tenido contacto con la cavidad oral. Los pacientes firmaron un consentimiento informado en el cual se entregó información acerca del uso de sus dientes para fines de investigación (Anexo 4). Los dientes en el momento de su extracción se almacenaron en una solución de timol al 0,2% y pH 7 para ser conservados hasta el día de su uso. Estos fueron guardados hasta 2 meses como máximo (Cury y cols., 1997).

Obtención de los bloques de esmalte (3 x 3 x 3 mm): Se obtuvieron del tercio medio coronal de los dientes (Ver Figura 1), estos fueron cortados con una sierra de diamante de baja velocidad (SYJ-150, MTI) y su forma final fue dada con un disco de acero diamantado de 0,20 mm de grosor marca Horico, montado en una pieza de mano y se obtuvieron 40 muestras divididas en dos, para el grupo estudio y control.

Luego, los bloques de muestras de esmalte fueron esterilizados por autoclave a vapor por 20 min. a 120°C.

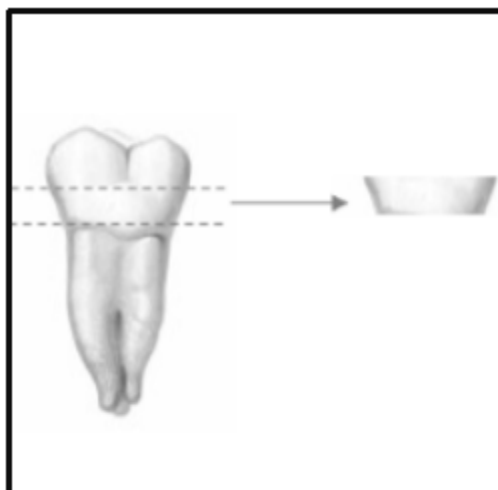


Figura 1. En el esquema se observa desde qué parte del esmalte se obtuvieron los bloques, el cual fue del tercio medio coronal.

6.5 Selección de voluntarios y preparación de los aparatos

<i>Criterios de inclusión</i>	<i>Registro</i>
Mínimo de 22 piezas dentales.	Ficha clínica
Pacientes tipo ASA I.	Auto reporte.
Edad 18-35 años.	Auto reporte.
COPD <8.	Ficha clínica

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

Lesiones de caries activas o cavitadas.	Ficha clínica
Uso de antibióticos o antifúngicos o antisépticos bucales 6 meses antes.	Auto reporte
Edéntulos.	Ficha clínica

Cada voluntario fue evaluado y registrado por la ficha clínica establecida (Anexo 1).

Preparación del dispositivo intra oral removible

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

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

La confección fue realizada en un laboratorio con instrucciones específicas; el dispositivo contó con 4 ranuras de 4x4x4 mm ubicadas en la zona vestibular de molares, 6 ranuras de 4x4x4 mm por palatino: 4 en la zona de molares, 1 en zona de premolares y 1 ranura en la zona media palatina (Ver figura 2).

Los bloques de esmalte fueron montados individualmente de forma aleatoria en cada ranura utilizando cera adhesiva de alta fusión y dejando un espacio protegido por acrílico de 1 mm para la acumulación de placa o biopelícula (Cury y cols., 1997).

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

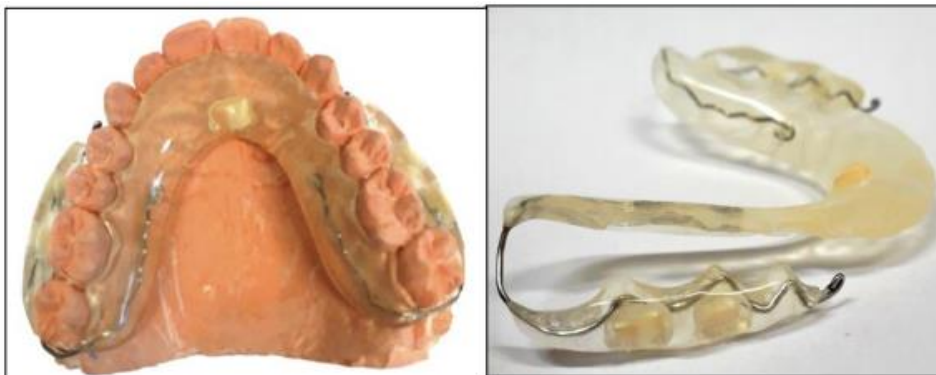


Figura 2. Dispositivo intraoral con bloques de esmalte. Aparato usado por los voluntarios.

6.6. Desarrollo estandarizado de lesiones de caries

Esta parte del estudio experimental *in situ*, se desarrolló en una fase de 14 días de duración. En ese período a cada una de las muestras se le aplicó una gota de sacarosa al 20% como desafío cariogénico, cada 2 horas hasta lograr 8 aplicaciones diarias (Cury y cols., 1997). La aplicación se realizó con un gotario fuera de boca, tras lo cual el voluntario esperó 5 minutos para volver a introducir el dispositivo (Tobar, 2021) (Ver figura 3). Luego se aleatorizaron en los grupos estudio y control.

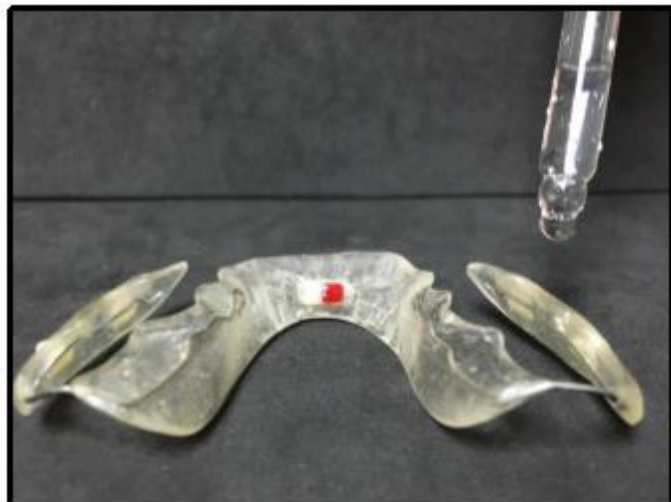
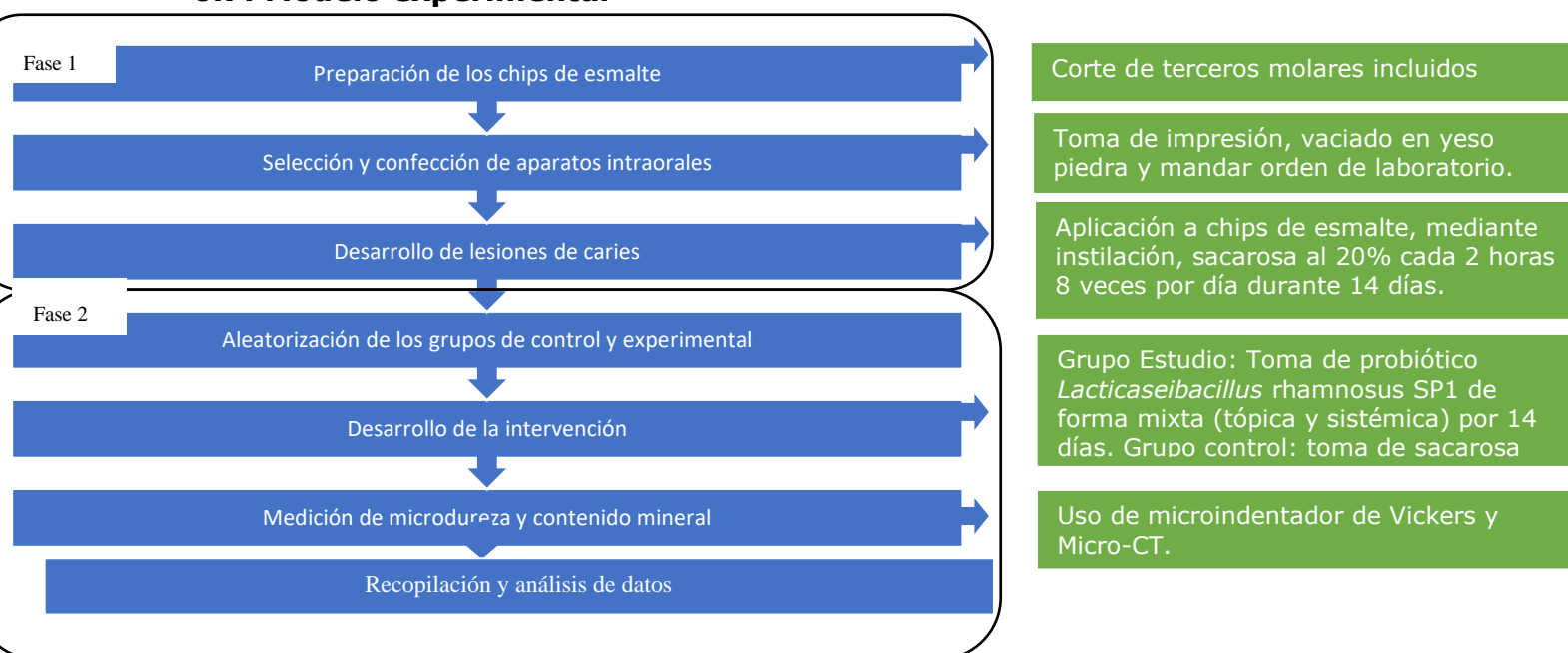


Figura 3. Desafío cariogénico. Instilación de una gota de sacarosa al 20% cada 2 horas 8 veces al día sobre los bloques de esmalte.

6.7. Modelo experimental



6.8 Intervención

El experimento *in situ* consistió en la medición en la progresión de lesiones de caries al usar el probiótico *Lactiseibacillus rhamnosus* SP1 de forma tópica y sistémica, es decir, de manera mixta, la cual es la forma habitual de consumo de probióticos.

Una vez realizados los dispositivo intra oral removible y probadas en boca de los voluntarios, se hizo una inducción acerca de la intervención a realizar, en donde se entregó toda la información acerca de ésta y un documento el cual firmaron una vez finalizada la inducción.

El desarrollo de la intervención fue en dos fases de 14 días cada una:

Fase 1, el desafío cariogénico, los participantes usaron el dispositivo intraoral durante todo el día exceptuando las comidas e higienización. Para generar la lesión de caries instilaron sacarosa al 20% cada 2 horas con un total de 8 aplicaciones al día, durante 14 días a todas las muestras de esmalte. Luego se recopilaron todas las muestras y se midió su densidad mineral, el cual fue útil para evaluar si hubo o no remineralización. Se usó el equipo SKYSCAN1272 de Bruker® usando el software SkyScan Data Viewer, CTan y CTvox3D para visualizar los cortes y las reconstrucciones en tres dimensiones de los bloques de esmalte para ver el contenido mineral.

En la segunda fase, también con una duración de 14 días, se produjo la exposición al probiótico. Para el grupo estudio, se continuó con el desafío cariogénico y se sumó la aplicación mixta del probiótico. Cada participante preparó una solución en 150 mL de agua con una dosis de *Lactocaseibacillus rhamnosus* SP1 de 10^8 UFC/mL y junto a la segunda aplicación de sacarosa tuvieron que aplicar una gota en cada bloque de esmalte y luego se tomaron el resto de la solución con el dispositivo intraoral fuera de boca. El grupo control continuó con el desafío cariogénico exclusivamente.

Pasado los 14 días de la fase 2, se recopilaron todos los bloques de esmalte para realizar las mediciones de micro dureza y contenido mineral de estos nuevamente. Para el primero se usó microindentador de Vickers Struers Duramin (USA) ubicado en el Laboratorio de Ciencias de los Materiales de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Chile con una carga de 1,961 Newton (N) por 10 seg.

6.9 Variables

Nombre variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable y su naturaleza	indicador
Microdureza	Grado de solidez producida por la cohesión existente entre sus partículas y su medición, se basa en la capacidad del material a resistir deformación permanente frente al contacto de un indentador.	Ensayo de dureza Vickers: una carga de 1,961 Newton (N) durante 10 seg. se aplica sobre la muestra a estudiar, dejando una huella en forma de rombo y que, a través de sus diagonales, calcula automáticamente la microdureza Vickers a razón de la siguiente formula: $VH = 1,854 \times F \times 10^3 / d^2$	Continua Dependiente Cuantitativa	Media con desviación estándar
Densidad Mineral dental	Cantidad de material inorgánico por unidad de área presente en un tejido, en este caso, esmalte dentario.	Micro-CT es una técnica que logra la formación de imágenes microscópicas y tridimensionales de rayos X en alta resolución, las imágenes reconstruidas procesadas muestran la	Continua Dependiente Cualitativa	Media con desviación estándar

		estructura interna de un objeto de forma no destructiva sin la necesidad de tratamiento, recubrimiento o vacío (Singhal y cols., 2013).		
--	--	---	--	--

6.10 Medición de los resultados

6.10.1 Mediciones densidad mineral

Los bloques de esmalte fueron escaneados en el equipo SKYSCAN1272 de Bruker® de alta resolución en tres ocasiones, previo a la fase 1, terminada la fase 1 y terminada la fase 2.

Las secciones de imágenes digitales fueron obtenidas con las siguientes condiciones de irradiación: 65 kV; 692 uA; 1 mm de filtro de Aluminio; 51.489000 um de tamaño de píxel, 360° de rotación al paso 0,25; tiempo de exposición de 36 ms con una cámara de 7,5 megapíxeles (Schwass y cols., 2009).

Una vez obtenidas las imágenes, se utilizó el software SkyScan Data Viewer, CTan y CTvox3D para visualizar los cortes y las reconstrucciones en tres dimensiones de los bloques de esmalte.

La calibración del nivel de gris se logró utilizando el esmalte de las muestras control como guía para determinar los valores de densidad mineral de diferentes partes del diente. Se utilizó el software CTan para medir la densidad mineral de las muestras.

6.10.2 Mediciones dureza superficial

Una vez terminada la fase 2, la dureza superficial se midió con un microindentador de Vickers Struers Duramin (USA) (Figura 4) ubicado en el Laboratorio de Ciencias

de los Materiales de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Chile. Se utilizó una carga de 200 g (1,961 N) por 10 seg a las muestras de esmalte, realizando 3 indentaciones distribuidas de manera aleatoria, las cuales se promediaron y se obtuvo el resultado para cada grupo.

La fórmula que se usará será la siguiente:

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

HV: microdureza de Vickers.

F: test de carga aplicada (N).

d: promedio de las diagonales de la indentación.

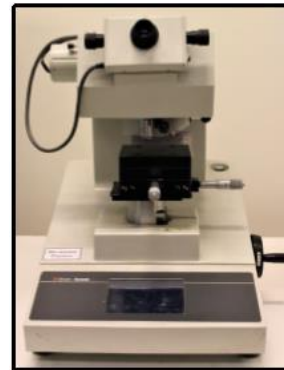


Figura 4. Microinductor de Vickers Struers Duramin (USA).

6.12 Plan análisis de datos

Se hizo auditoria de base de datos por un solo operador, se utilizó Excel Office 2012 para Windows para la recopilación de datos. Luego se realizó una prueba T-test (Student's T-Test) para valores paramétricos y Wilcoxon rank-sum test para valores no paramétricos. Se desarrolló un análisis descriptivo de los datos de microdureza y densidad mineral de la muestras de cada grupo. Se comparó medias y medianas, se consideraron diferencias significativas si el valor del p-value obtenido es igual o menor a 0,05.

VII. RESULTADOS.

El número total de voluntarios fue de 4, los cuales completaron en su totalidad el estudio, donde hubo solo una muestra perdida (bloque de esmalte). El total de las muestras fueron recolectadas luego del término de cada fase y medidas en Micro-CT para determinar la densidad mineral de éstas y en el microindentador de Vickers para medir su microdureza superficial. Todos los voluntarios fueron supervisados diariamente si cumplieron correctamente con el protocolo durante todo el experimento (Anexos 6 y 7).

7.1 DENSIDAD MINERAL

Antes del inicio de la fase 1, los bloques de esmalte fueron escaneados por Micro-CT para cuantificar la densidad mineral inicial, luego fueron instalados en los dispositivos intraorales y entregados a los 4 voluntarios para iniciar la formación de lesiones de caries (fase 1). Una vez terminada esta fase, se recolectaron los bloques de esmalte, se volvió a medir por Micro-CT cada uno de ellos para cuantificar su densidad mineral luego de ser expuestos a sacarosa. Se aleatorizaron los bloques y se volvieron a entregar a los voluntarios para iniciar la fase 2. Terminada ésta, se recolectaron nuevamente todos los bloques de esmalte, dividiendo estos en dos grupos, estudio (probiótico/sacarosa) y control (sacarosa) y se volvió a medir cada uno en Micro-CT, utilizando código de colores para poder observar las densidades minerales y la distribución de esta en el esmalte.

La tabla N°1 es un análisis descriptivo que muestra los valores de la densidad mineral (BMD1) por Micro-CT, antes de la primera fase del estudio, eso quiere decir antes de la formación de la lesión de caries.

Tabla N°1. Promedio y desviación estándar de la densidad mineral (BMD1) medida por Micro-CT, según cada grupo de la muestra, antes de la primera fase de estudio.

GRUPOS DE ESTUDIO	MEDIA INICIAL BMD1 (GR/CM ³)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	N
ESTUDIO	2,9	0,13	19
CONTROL	2,81	0,05	20

p>0,05.

El análisis inicial de la media de Bone Media Density (BMD) de los 2 grupos de estudio, se realizó con T-test, esto considerando que los datos se distribuyen de manera normal. Las diferencias no son significativas al comparar los dos grupos entre ellos.

La tabla N°2 es un análisis descriptivo que muestra los valores de la densidad mineral (BMD2) por Micro-CT, luego de la primera fase de estudio, que consistió en formar la lesión caries.

Tabla N°2. Promedio y desviación estándar de la densidad mineral (BMD2) medida por Micro-CT, según cada grupo de la muestra, luego de la primera fase de estudio (formación de la lesión artificial).

GRUPOS DE ESTUDIO	MEDIA BMD2 (GR/CM ³)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	N
ESTUDIO	2,38	0,14	19
CONTROL	2,38	0,13	20

p>0,05.

El análisis inicial de la media de Bone Media Density (BMD) de los 2 grupos de estudio, se realizó con T-test, esto considerando que los datos se distribuyen de manera normal. Las diferencias no son significativas entre ellos.

La tabla N°3 es un análisis descriptivo que muestra los valores de la densidad mineral (BMD3) por Micro-CT, terminada la fase dos del estudio experimental.

Tabla N°3. Mediana y desviación estándar de la densidad mineral obtenida (BMD3) por Micro-CT, luego de la segunda fase de estudio (probiótico y/o sacarosa).

GRUPOS DE ESTUDIO	MEDIANA BMD3 (GR/CM ³)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	N
ESTUDIO	2,12*	0,10	19
CONTROL	2,05*	0,14	20

*p<0,05

El análisis de comparación de 2 grupos de estudio se realizó con Wilcoxon rank-sum test considerando la distribución anormal de los datos. Se muestran diferencias significativas luego de realizar el análisis comparativo entre ambos grupos.

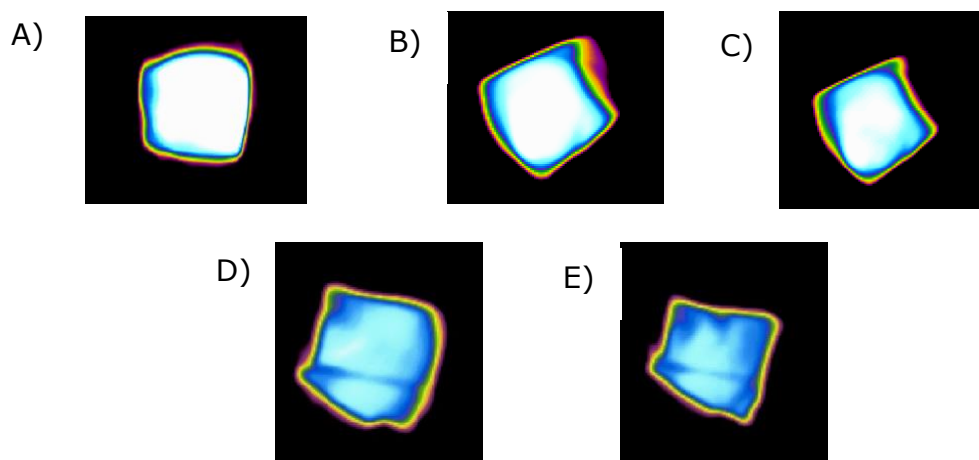


Figura 5. Imágenes obtenidas mediante Micro-CT con el software Ctan.A correspondientes a las muestras de esmalte y su densidad mineral en las distintas fases del estudio (voltaje de 50 kv y fuente de corriente de 1005 uA).

A) BMD1 del bloque de esmalte sano. B) BMD2 después de la primera fase de estudio (desafío cariogénico). C) BMD3 posterior a la segunda fase de estudio expuesto a

probiótico. D) BMD2 primera fase de estudio, bloque de esmalte (control). E) BMD3 del bloque de esmalte control expuesto a sacarosa.

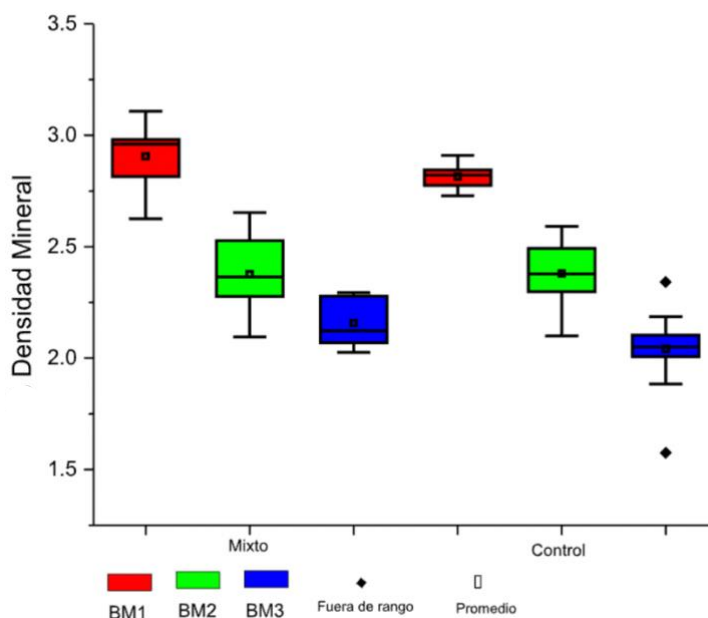


Figura 6. Valores de densidad mineral de BM1, BM2 y BM3 de las muestras en cada fase del experimento para los bloques de esmalte según grupo.

Se muestran diferencias significativas entre la densidad mineral BM3 (azul) entre los grupos estudio y control.

7.2 MICRODUREZA SUPERFICIAL

La tabla N°4 es un análisis descriptivo que muestra los valores de microdureza medido por Microindentador de Vickers Struers Duramin.

Tabla N°4. Análisis descriptivo, se observan valores de la microdureza superficial (MDS3) en durómetro, una vez terminada la fase 2.

GRUPOS DE ESTUDIO	MEDIA MDS3	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	N
ESTUDIO	260,50*	28,27	19
CONTROL	180,60*	59,65	20

*p<0,05

Se realizó la comparación de ambos grupos con el test Wilcoxon rank-sum, considerando la distribución anormal de los datos. Se muestran diferencias significativas luego de realizar el análisis comparativo entre ambos grupos, P<0,05.

VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo de investigación a través de un modelo *in-situ* de caries, se expuso a 2 de 4 voluntarios, como grupo estudio, a la ingesta del probiótico *L. rhamnosus* SP1 de forma mixta, eso quiere decir de manera tópica y sistémica, durante 14 días. Mientras que a la otra mitad, se expuso solo a sacarosa, como grupo control. Se obtuvo un total de 39 bloques de esmalte como muestra, los cuales fueron divididos en dos grupos, el grupo control (20) y el estudio (19) estos fueron analizados en 3 momentos para evaluar su densidad mineral, previo a la formación de las lesiones de caries, posterior a la formación de las lesiones de caries y posterior a la administración del probiótico de forma mixta, en esta última también se evaluó la microdureza superficial de los bloques de esmalte. Con estos resultados fue posible evaluar los efectos del probiótico de uso mixto sobre la progresión de lesiones de caries en el esmalte dental. Se perdió solamente 1 bloque de esmalte durante todo el estudio, lo cual es menos del 5% establecido como margen por lo que los resultados obtenidos no se vean alterados.

Con respecto a las imágenes obtenidas por microtomografía computada (Micro-CT), estas permitieron estudiar de forma tridimensional y no destructiva los bloques de esmalte sometidos al experimento, entregando resultados cualitativos y cuantitativos. Antes de iniciar el proceso de formación de las lesiones de caries, se realizó la primera medición de densidad mineral de los grupos estudio y control, los cuales comenzaron con $2,90 \pm 0,13$ gr/cm³ y $2,81 \pm 0,05$ gr/cm³, respectivamente, sin diferencias estadísticamente significativas. Estos valores fueron similares a los reportados por Dowker, entre 2,60 gr/cm³ y 3,10 gr/cm³ en esmalte sano (Dowker y cols., 2003). Estos resultados eran esperables ya que los bloques de esmalte fueron obtenidos de terceros molares incluidos que no tuvieron contacto con la cavidad oral. Entre las ventajas que tiene el uso del Micro-CT es que permite caracterizar y observar los cambios estructurales que ocurren en la densidad mineral de la lesión de caries sin la necesidad de seccionar o preparar la muestra.

Los resultados cuantitativos de la densidad mineral terminada la fase 1 resultaron en la estandarización de la formación de lesión caries *in situ*, ya que los resultados de la media en ambos grupos, control y estudio fue de $2,38 \text{ gr/cm}^3$, sin diferencias significativas entre ambos grupos, coincidiendo con los valores obtenidos por Dowker ($2,1-2,7 \text{ gr/cm}^3$) y Seguel ($2,54 \pm 0,22 \text{ gr/cm}^3$) (Dowker y cols., 2003; Seguel, 2020). Esta disminución en la densidad mineral de los bloques de esmalte evidencia que efectivamente se pudo estandarizar la formación de lesiones de caries en modelos *in situ* y que el estar todos en un mismo nivel de desmineralización, permitió poder aleatorizar de mejor forma cada bloque para poder iniciar la fase 2 experimental y así poder comparar de mejor manera los efectos del probiótico aplicado de manera mixta en la densidad mineral de un esmalte ya desmineralizado. Además, actualmente no existe evidencia científica publicada que haya evaluado mediante Micro-CT el efecto de probióticos en modelos *in situ* en la superficie del esmalte dental desmineralizado, por lo tanto no se pueden hacer comparaciones de estos resultados, sin embargo se abre la posibilidad de usar esta metodología en las próximas investigaciones que se utilice tejido desmineralizado y no esmalte sano.

Una vez terminada la fase 2, se observaron diferencias significativas, entre el grupo control ($2,05 \pm 0,14 \text{ gr/cm}^3$) expuesto a sacarosa y el grupo experimental ($2,12 \pm 0,10 \text{ gr/cm}^3$) expuesto al probiótico y sacarosa, este último presentó mayores valores de densidad mineral. Por lo que se puede evidenciar una tendencia a la disminución del proceso de caries dental en los sujetos del grupo experimental que fueron expuestos al probiótico de forma mixta. No obstante, estos resultados indican que el probiótico *L. rhamnosus* SP1 al ser administrado de esa manera no detiene el proceso de formación de lesión de caries, más bien tiene un efecto reductor, disminuyendo la cantidad de mineral que se perdió en el mismo periodo de tiempo que el grupo control.

La medición de microdureza que se utilizó en esta investigación, es un método confiable para recopilar información sobre cambios en el contenido mineral de los tejidos dentales (Mandava y cols., 2017). Los valores de microdureza superficial obtenidos en este estudio revelaron que el valor promedio de las muestras de esmalte del grupo experimental sometido al probiótico, de forma mixta, junto a la sacarosa es

superior ($260,50 \pm 28,27$) al valor promedio del grupo control solamente expuesto a sacarosa ($180,60 \pm 59,65$), llegando a ser esta diferencia estadísticamente significativa. Esto indica que en el grupo estudio debido a que hubo una menor pérdida de minerales presenta una mayor microdureza superficial al ser expuestos de manera mixta al probiótico *L. rhamnosus* SP1. No obstante, los valores de microdureza superficial del grupo experimental son menores al de esmalte sano ($390,69 \pm 11,90$) (Palti y cols., 2008), indicando nuevamente que la exposición del tejido cariado al probiótico de forma mixta tiene un efecto atenuante de la progresión de formación de la lesión de caries. Al realizar una comparación de los resultados obtenidos por otros trabajos de investigación realizados años anteriores los cuales utilizaron el mismo método de formación de caries *in situ*, los resultados de microdureza del grupo control son parecidos (Seguel, 2020; Azán 2019; Colil, 2019).

El principal motivo por el cual no se realizaron mediciones de microdureza previo a la fase 1 y fase 2 es que luego de usar el microindentador de Vickers sobre las muestras de esmalte, éstas ya no se pueden usar para otros estudios debido que su superficie externa se daña por las fuerzas que se aplican con el microindentador de Vickers. Lo que se pudo haber hecho, era aumentar el tamaño muestral y destinar algunas de las muestras a ser medidas previo a la fase 1 y otra previo a la fase 2.

Entre los beneficios que conlleva el uso de un modelo *in situ* de caries es poder reproducir y simular condiciones intraorales no controladas, incorporando los parámetros experimentales controlados que se quieren estudiar (Jablonski y cols., 2020). Como existen beneficios también tiene importantes limitaciones al momento de usar este tipo de modelo, por ejemplo, el compromiso de los voluntarios, ya que requieren monitoreo diario debido a que el estricto cumplimiento de los participantes en este estudio *in situ* era determinante para poder obtener resultados confiables. Además, conseguir voluntarios que quieran participar debido a que el uso de una placa removible durante un periodo casi de un mes es algo que haría dudar la participación de un estudio experimental, esto se podría mejorar acortando los tiempos de éste. Por lo tanto, para poder realizar un estudio *in situ* se requiere a un equipo de trabajo muy minucioso y comprometido, tener buena comunicación con los voluntarios y que

estos estén igual de comprometidos con el estudio para finalizar éste de manera exitosa.

El uso de probióticos para la prevención y tratamiento de enfermedades en la cavidad oral ha sido respaldada por muchos estudios en los últimos años (Teughels y cols., 2008; Twetman y cols., 2012; Seminario-Amez y cols., 2017). Un problema es que los diversos mecanismos de acción de los probióticos no se conocen por completo. En general, se cree que existen efectos locales y sistémicos combinados que involucran la adhesión, la coagregación, la inhibición competitiva, la producción de ácidos orgánicos y compuestos similares a la bacteriocina, y la inmunomodulación (Teughels y cols., 2008). Otros probióticos muestran adhesión y colonización (al menos transitoria) del cuerpo humano, lo que puede aumentar su tiempo de retención, facilitando así una actividad probiótica prolongada (Fierro Monti y cols., 2017). En consecuencia, la composición y la actividad metabólica de la biopelícula oral pueden modificarse temporalmente. Los efectos de las bacterias probióticas parecen específicos según la cepa, y no se puede aplicar directamente a otras cepas. Además, las mismas cepas pueden tener un efecto diferente en diferentes individuos (Twetman, 2012).

Estudios afirman que las cepas de probióticos pueden detectarse en la saliva durante su consumo, pero cuando cesa el consumo, desaparecen de la cavidad bucal en pocas semanas. Algunos de los estudios fueron ensayos clínicos a corto plazo (días o semanas), y otros estudios a largo plazo (de seis meses a un año). Utilizaron diferentes vehículos (tabletas, leche, helado, queso y dulces) y trabajaron con diferentes grupos de edad (Marttinen y cols., 2012; Ashwin y cols., 2015; Nishihara y cols., 2014).

Se utilizó la cepa probiótica *L. rhamnosus* SP1 debido a la evidencia científica publicada anteriormente, donde ésta tuvo propiedades contra bacterias cariogénicas en ensayos clínicos randomizados, en donde hubo una disminución en el desarrollo de caries cavitadas en el grupo tratado con el probiótico, esta intervención demostró efectividad del probiótico pero aún no está claro la dosis exacta, el tiempo efectivo de

tratamiento, ni el mejor vehículo para llevar a cabo procedimientos experimentales y poder maximizar su efecto protector/atenuante (Rodríguez y cols., 2016). Al igual que aún se desconoce si es la cepa más efectiva contra la enfermedad de caries, faltan más estudios al respecto y profundización del tema.

Respecto a los resultados obtenidos en trabajos de investigación en paralelo, con la misma metodología pero distintas formas de aplicación del probiótico, sistémico y tópico, se observaron resultados similares a los descritos en éste experimento, lo que indicaría que no existe una forma de aplicación con mayor efectividad sino que el resultado radica en la aplicación del probiótico como tal (Muñoz, 2022; Naveillan, 2022).

El presente estudio, luego de todos los análisis realizados, ha contribuido que el probiótico *L. rhamnosus* SP1, administrado de forma mixta, es efectivo en atenuar la desmineralización de lesiones de caries ya existentes, así ralentizando el avance de éstas y también la formación de una cavidad en esmalte.

IX. CONCLUSIONES

Los resultados demostraron que el probiótico *L. rhamnosus* SP1 administrado de forma mixta, tópico y sistémico, tiene un efecto benéfico/atenuante frente a la tasa de progresión de desmineralización del esmalte en el proceso de formación de la lesión de caries.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Ashwin D, Ke V, Taranath M, Ramagoni NK, Nara A & Sarpangala M. Effect of Probiotic Containing Ice-cream on Salivary Mutans Streptococci (SMS) Levels in Children of 6-12 Years of Age: A Randomized Controlled Double Blind Study with Six-months Follow Up. *J Clin Diagn Res* 2015;9(2):ZC06-9 doi: 10.7860/JCDR/2015/10942.5532.

Azán, P. (2019). Efecto del consumo de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en la densidad mineral, dureza superficial y morfología superficial de esmalte en un modelo in situ de caries. Universidad de Chile.

Banna, G. L., Torino, F., Marletta, F., Santagati, M., Salemi, R., Cannarozzo, E., Falzone, L., Ferrà, F., & Libra, M. (2017). *Lactobacillus rhamnosus* GG: An overview to explore the rationale of its use in cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 8(SEP), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00603>

Comelli, E. M., Guggenheim, B., Stingle, F., & Neeser, J. R. (2002). Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health. *European Journal of Oral Sciences*, 110(3), 218–224. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0447.2002.21216.x>

Coqueiro AY, Bonvini A, Razei R, Tirapegui J, Rogero MM. Probiotic supplementation in dental caries: is it possible to replace conventional treatment? *Nurtire*. 2018;43(6):1–9.

Cury, J. A., Rebello, M. A. Cury D. B. (1997) In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. *Caries Res* 31:56-360 sd

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

Fejerskov, O., & Kidd, E. A. M. (2013). *Dental Caries: the disease and its Clinical*

Management. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Fierro Monti, C., Aguayo Saldías, C., Lillo Climent, F., & Riveros Figueroa, F. (2017). Role of probiotics as bacteriotherapy in dentistry: a literature review. *Odontoestomatología, Vol XIX*(No 30), 634.

Hasslöf, P., & Stecksén-Blicks, C. (2019). Chapter 10: Probiotic bacteria and dental caries. *Monographs in Oral Science, 28*, 99–107.
<https://doi.org/10.1159/000455377>

Hollanders, A. C. C., Kuper, N. K., Maske, T. T., & Huysmans, M.-C. D. N. J. M. (2018). *Secondary Caries in situ Models: A Systematic Review. Caries Research, 454–462*. doi:10.1159/000487200

Jablonski A, Korbmacher H, Heinzl M, Jablonski B, Jaquet W, Bottenberg P (2020). Randomised in situ clinical trial investigating self-assembling peptide matrix P11-4 in the prevention of artificial caries lesions. *Scientific Reports*

Luoto, A., Lahti, S., Nevanpera, T., Tolvanen, M., & Locker, D. (2009). Oral-health-related quality of life among children with and without dental fear. *International Journal of Paediatric Dentistry, 19*(2), 115–120. <https://doi.org/10.1111/j.1365-263X.2008.00943.x>

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

María Paz Colil Orellana. (2019). Efecto Del Uso Tópico Del Probiótico Lactobacillus Rhamnosus Sp1 En Un Modelo De Caries in Situ. *Universidad De Chile*.

Marttinen A, Haukioja A, Karjalainen S, Nylund L, Satokari R, Öhman C, Holgerson

P, Twetman S & Söderling E. Short-term consumption of probiotic lactobacilli has no effect on acid production of supragingival plaque. *Clin Oral Investig*. 2012;16(3):797-803.

Marsh, P. D. (2018). In Sickness and in Health-What Does the Oral Microbiome Mean to Us? An Ecological Perspective. In *Advances in dental research* (Vol. 29, Issue 1, pp. 60–65). *Adv Dent Res*. <https://doi.org/10.1177/0022034517735295>

MINSAL, C. (2010). *Análisis Situación bucal en Chile*.

Muñoz, S. (2022) "Efecto en la progresión de lesiones de caries en esmalte en un modelo in situ, mediante el uso de probióticos de manera sistémica". Universidad de Chile.

Näse, L., Hatakka, K., Savilahti, E., Saxelin, M., Pönkä, A., Poussa, T., ... Meurman, J. H. (2001). *Effect of Long-Term Consumption of a Probiotic Bacterium, Lactobacillus rhamnosus GG, in Milk on Dental Caries and Caries Risk in Children*. *Caries Research*, 35(6), 412–420. doi:10.1159/000047484

Naveillan, J. (2022) "Efecto del probiótico *Lacticasebacillus rhamnosus* SP1 de manera tópica, en la progresión de lesiones de caries de esmalte, en un modelo *in situ*". Universidad de Chile.

Nishihara T, Suzuki N, Yoneda M & Hirofujii T. Effects of Lactobacillus salivarius-containing tablets on caries risk factors: a randomized open-label clinical trial. *BMC Oral Health*. 2014. 2;14:110

O'mullane, D. M., Baez, R. J., Jones, S., Lennon, M. A., Petersen, P. E., Rugg-Gunn, A. J., Whelton, H., & Whitford, G. M. (2016). Fluoride and Oral Health Sections. *Community Dental Health*, 33, 69–99. https://doi.org/10.1922/CDH_37070

Palti, D. G., Machado, M. A. de A. M., Silva, S. M. B. da, Abdo, R. C. C., & Lima, J. E. de O. (2008). *Evaluation of superficial microhardness in dental enamel with different eruptive ages. Brazilian Oral Research, 22(4), 311–315.* doi:10.1590/s1806-83242008000400005

Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, Tagami J, Twetman S, Tsakos G, Ismail A. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers.* 2017 May 25;3:17030.

Piwat, S., Teanpaisan, R., Manmontri, C., Wattanarat, O., Pahumunto, N., Makeudom, A., ... Nirunsittirat, A. (2020). *Efficacy of Probiotic Milk for Caries Regression in Preschool Children: A Multicenter Randomized Controlled Trial. Caries Research, 1–11.* doi:10.1159/000509926

Robinson, C., Shore, R. C., Brookes, S. J., Strafford, S., Wood, S. R., & Kirkham, J. (2000). The chemistry of enamel caries. In *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* (Vol. 11, Issue 4, pp. 481–495). Intern. and American Associations for Dental Research. <https://doi.org/10.1177/10454411000110040601>

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

Schwass, D.R. Swain, M.V. Purton D.G, J. W. L. (n.d.). *A System of Calibrating Microtomography for Use in Caries Research.*

FAO/WHO. (2002). *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.* 1–11.

Singh, V. P., Sharma, J., Babu, S., & Singla, A. (n.d.). Role of probiotics in health and disease: A review. *J Pak Med Assoc, 253–257.*

Singhal, A., Grande, J. C., & Zhou, Y. (2013). Micro/Nano-CT for Visualization of Internal Structures. *Microscopy Today, 21(2), 16–22.*

<https://doi.org/10.1017/s1551929513000035>

Ten Cate JM, Featherstone JD. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1991;2(3):283-96.

Teughels, W., Van Essche, M., Sliepen, I., & Quirynen, M. (2008). Probiotics and oral healthcare. *Periodontology 2000*, 48(1), 111–147.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2008.00254.x>

Twetman, S., & Keller, M. K. (2012). Probiotics for caries prevention and control. *Advances in Dental Research*, 24(2), 98–102.

<https://doi.org/10.1177/0022034512449465>

Vandenplas, Y., Huys, G., & Daube, G. (2015). Probiotics: An update. *Jornal de Pediatria*, 91(1), 6–21. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2014.08.005>

Wang, Y., Mei, L., Gong, L., Li, J., He, S., Ji, Y., & Sun, W. (2016). Remineralization of early enamel caries lesions using different bioactive elements containing toothpastes: An in vitro study. *Technology and Health Care*, 24(5), 701–711.

<https://doi.org/10.3233/THC-161221>

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

Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.yapd.2017.03.011>

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

Zero DT. Dental caries process. *Dent Clin North Am*. 1999 Oct;43(4):635-64.

Anexos

Anexo 1: Ficha Clínica

Evaluación de voluntarios para participación en trabajo de investigación titulado
“Efecto del uso del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 de forma tópica y sistémica en la progresión en lesiones de caries de esmalte en un modelo *in situ* en la cavidad oral”

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

Anamnesis

- | | |
|--|--|
| <p>1. Antecedentes mórbidos:</p> <p>2. Antecedentes quirúrgicos (Fecha, diagnóstico, procedimiento, complicaciones):</p> <p>3. Alergias:</p> <p>4. Medicamentos (Nombre, dosis, fecha inicio):</p> | <p>5. Hábitos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tabaco: - Alcohol: - Drogas: - Controles odontológicos (frecuencia, fecha último control) <p>6. Higiene Oral:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Frecuencia del cepillado: - Ocasión: - Tipo de cepillo: - Pasta: - Enjuague |
|--|--|

Examen Intraoral

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

Anexo 2: Consentimiento informado voluntarios

Universidad de Chile

Facultad de odontología

Carta de Consentimiento Informado

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

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

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

Identificación paciente

Nombre: _____

Rut: _____

Fono: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Sección para llenar por el investigador principal

He explicado al Sr.(a) _____ la naturaleza de la investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas y he preguntado

si tiene alguna duda. Acepto que conozco la normativa vigente para realizar la investigación con seres humanos y me apegó a ella.

Nombre del investigador principal

Nombre: _____

Rut: _____

Fono: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Nombre del Director del establecimiento de investigación o de su representante

Nombre: _____

Rut: _____

Fono _____

Firma: _____

Fecha: _____

Anexo 3: Aprobación comité de ética



Ed-24 Agosto 2017

ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

INFORME N°:2016/30

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

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

Dr. Eduardo Fernández
Presidente CEC

Dr. Marco Cornejo
Vicepresidente CEC

Dra. Weronika Weil
Miembro Permanente CEC

Sra. Paulina Navarrete
Miembro Permanente CEC

Sr. Roberto La Rosa
Miembro Permanente CEC

Dr. Rodrigo Cabello
Miembro Permanente CEC

Dr. Alfredo Molina
Miembro Permanente CEC

Dra. Paola Llanos
Miembro Permanente CEC

Dr. Juan Estay
Miembro Permanente CEC

Sra. Rebeca Galarce
Representante de la Comunidad

Dra. Viviana Toro
Miembro Alterno CEC

2. Fecha de Aprobación: 03/05/2017

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

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

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

6. Fundamentación de la aprobación

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

RESPECTO A ASPECTOS METODOLÓGICOS:

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

RESPECTO A ASPECTOS JURIDICOS:

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

Ed-24 Agosto 2017

RESPECTO A ASPECTOS ÉTICOS:

Realizar las siguientes modificaciones al C.I.:

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

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



Dr. Eduardo Fernández G.
Presidente CEC



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

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



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

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

Investigador Principal: Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez

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

Nombre del Donante

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

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

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

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

Justificación de la Investigación

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

Objetivo

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

Beneficios

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

Tipo de Intervención y Procedimiento

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

Riesgos

Los dientes donados se utilizarán sólo con el fin expuesto y no se guardará ningún registro de su relación con usted como donante. Ningún otro tipo de estudio se realizará con los dientes. Una vez observados y 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.



Anexo 5: Protocolo a seguir por voluntarios



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

Estimado Participante, bienvenido al estudio agradecemos profundamente su generosa disposición para ser parte de este proyecto de investigación. A continuación, explicaremos paso a paso las maniobras que deberá realizar durante el periodo de experimentación.

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

- Dispositivo intraoral: es una estructura acrílica removible que tiene incorporadas 10 muestras dentarias: 1 muestra en la zona palatina, 2 muestras en la zona vestibular derecha, 2 muestras en la zona vestibular izquierda, 5 en la zona palatina posterior (fig. 1).



Figura 1: Dispositivo intraoral

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

Ud. deberá utilizar el dispositivo intraoral durante un periodo de 28 días, 24 horas al día. Sólo podrá remover el dispositivo de la boca para higienizarse los dientes (cepillado), beber líquidos o comer. Esto significa que deberá dormir con el dispositivo por el tiempo que dure el estudio, además el dispositivo podrá ser removido máximo 4 veces al día, 30m cada vez.

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

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

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

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

Todos los elementos entregados para el estudio se deben guardar en el bolso original y al finalizar el estudio se deben entregar de la misma forma al equipo investigador.

Protocolo inicial (generación de lesión artificial):

Paso 1:

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

Paso 2:

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

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

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

Protocolo de intervención probiótico vía sistémica y tópica:

Paso 1:

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

Paso 2:

- 2 horas después de la primera aplicación de sacarosa, nuevamente debe retirar el dispositivo de la boca y utilizar el probiótico de la siguiente manera:
 - Abrir el probiótico ponerlo en el frasco grande y mezclarlo con agua.
 - Debe aplicar 1 gota de probiótico en cada bloque de esmalte
 - Lo restante debe ingerirlo

Paso 3:

- Luego del paso 2, aplicar inmediatamente 1 gota de sacarosa en todos los bloques de esmalte e introduce nuevamente el dispositivo dentro de la boca.

Paso 4:

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

Anexo 7: Evaluación de cumplimiento final.



Universidad de Chile
Facultad de odontología
Evaluación de cumplimiento final

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

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

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

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

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

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