



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

**“EL USO DE SIMBIÓTICOS DE *LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS* CON  
VITAMINA D Y *LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS* CON VITAMINA C  
PARA LA PREVENCIÓN DE CARIES DENTAL”**

**Natalia Isidora Saavedra Jaña**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Dr. Rafael Contador Cotroneo**

**Dra. Patricia Palma Fluxá**

**Adscrito a Proyecto FonDOR 2022/02**

**Santiago - Chile**

**2024**





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

**“EL USO DE SIMBIÓTICOS DE *LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS* CON  
VITAMINA D Y *LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS* CON VITAMINA C  
PARA LA PREVENCIÓN DE CARIES DENTAL”**

**Natalia Isidora Saavedra Jaña**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Dr. Rafael Contador Cotroneo**

**Dra. Patricia Palma Fluxá**

**Adscrito a Proyecto FonDOR 2022/02**

**Santiago - Chile**

**2024**

## DEDICATORIA

*Le dedico esta tesis a mi familia, mis papás Myriam y Jorge, mis hermanos Viviana y Martin, y mi May.*

*A mi pareja y mi mejor amigo, Felipe.*

*Y a mis perros, Toby, Pepa, Kenay, Vittoria, Tony y a Agustina que está en el cielo de los perritos, por dejarme el uniforme lleno de pelos.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a mi familia, porque sin su apoyo no estaría hoy en día donde estoy. A mi mamá, Myriam por enseñarme a ser perseverante y siempre creer en mis capacidades, gracias por enseñarme lo que es tener vocación en salud; a mi papá, Jorge por siempre apoyarme en todos mis logros y siempre incentivarme en lograr cada día más, a mis hermanos Viviana y Martín, por ayudarme a verle el lado positivo a las situaciones feas y apoyarme, aunque solo me escucharan quejarme, a mi May, por criarme con cariño y cuidarme desde que tengo memoria.

A mis perritos Toby, Pepi, Kenay, Tony, Vittoria y Agustina, que sin saberlo han sido parte importante de todo este proceso. Por siempre acompañarme hasta muy tarde mientras estudiaba, por recibirme felices cuando tenía un buen día o por acurrucarse conmigo en días malos o cuando llegaba cansada, por acostarse en mis apuntes para que les hiciera cariño en vez de estudiar, y por adornar mis uniformes con sus pelitos.

A mi pareja, mi mejor amigo y mi mayor fan, Felipe. Nos conocimos gracias a esta carrera y no hubo ningún momento en que no sintiera lo mucho que me apoyaste en todo este proceso, lo feliz que estabas por todos mis logros y lo seguro que estas de que puedo lograr muchas cosas más. Gracias por acompañarme en los momentos mas feos de todo este proceso, por dejarme llorar cuando estaba abrumada y por hacerme reír para alegrarme el día. Gracias por hacerme feliz.

También quiero agradecer a la familia de Felipe, su mamá Jessica, sus hermanos Fernanda, Martín y Paula, y sus perritos, Luka, Julieta y Panchito, por abrirme las puertas de su casa e incluirme como si fuera una hija más. Gracias por el cariño que siempre me han mostrado.

A mis amigas que me han acompañado desde los primeros días de la Universidad: Isa, Barbi, Dani, Yudi y Nicolás, por quererme como soy y sin exigirme nada. Gracias por ser mis compañeras en los momentos feos de la clínica y en los

divertidos. Siempre voy a recordar con cariño los chismes, las juntas, los conciertos, las risas y las salidas a cafecitos que compartimos durante estos 8 años.

También a mis ratas: Darco, Maite, Cata, Sole y Cami, por siempre estar para mí, por darme apoyo en mis peores días, por levantarme el ánimo cuando estuve en lo más bajo y quería renunciar. Gracias por siempre alegrarse por mí y por permitirme quererlos también.

Gracias a TVO por darme la oportunidad de conocer otras realidades, por permitirme reenamorarme de la carrera, por dejarme explorar otra versión de mí como coordinadora, y por la gente maravillosa que me permitió conocer, Diego, Coni, Pollito, Carlos, Almendra y Barbi, a quienes tengo el placer de poder seguir llamando amigos.

A Ceci, Sigrid, Ismael, Victor y a toda la gente que conocí gracias a Felipe que siempre han sido amables y lindos conmigo. Gracias por verme como más que solo la pareja de alguien, sino como amigos y alguien en quien puedo confiar.

A mis amigos de toda la vida que siempre creyeron en que podría lograrlo, aunque me demorara mil años: Dari, Rifo, Milla, Karla, Vega y Anto. Gracias por todos estos años de risas.

A mis tías Tere, Eliana y Paty por siempre alegrarse de mis logros. A mi primo Camilo. A mi viejito lindo, que aunque ya no está siempre se enorgulleció de mí y siempre tuvo la total certeza de que iba a ser la mejor dentista. Gracias por creer en mí.

Gracias a mis compañeros de clínica con los que fue maravilloso trabajar: Yudi, Darco, Javi y en especial a Mónica por tantos años siendo compañeras. Ustedes hacían que la clínica fuera mucho más llevadera. Gracias por acompañarme no solo cuando me salían bien las cosas, sino también por darme ánimos cuando veía todo negro.

Agradecer también a mis pacientes, aquellos a los que era un gusto atender y que me trataban con tanto cariño y que muchas veces me regalaban con un engaño. Gracias por tenerme paciencia mientras los atendía y que sepan que lo hice con mucho cariño.

A los y las funcionarias que siempre me recibieron con mucho cariño y con una sonrisa. A Nico y Javi que siempre tuvieron un tiempo para mí, gracias por permitir compartir un pedacito de mí con ustedes, así como ustedes lo hicieron conmigo, gracias por los momentos dulces, por los abrazos cuando más necesitaba y por los chismes. Gracias también a la Glorita que siempre me trató con mucho cariño.

A los docentes que me marcaron en esta carrera, no solo por lo mucho que aprendí de ellos, sino también por el cariño que me entregaron. En específico a la Dra. Silvana Maggiolo, que no solo es excelente docente, sino también una maravillosa persona.

Al equipo encargado de este proyecto sin el cual nada de esto hubiera sido posible. A mi tutor el Dr. Gonzalo Rodríguez por siempre apoyarme y recibirme con una sonrisa, por incentivar a que haga más y que intente nuevas cosas aunque no me atreva. A mis otros tutores el Dr. Rafael Contador, por siempre estar dispuesto a ayudarnos y hacer todo este proceso mucho más ameno y divertido; y a la Dra. Patricia Palma por ayudarnos a introducirnos en el mundo del laboratorio con mucha paciencia. Agradecer también a la gente del LabMIO, todos muy amables y dispuestos a ayudarnos cada vez que tuvimos dudas. Y, por último, agradecerles a mis compañeros de tesis, Felipe y George, sino los cuales no podría haber llegado hasta aquí. Gracias por hacer de este proceso algo tan alegre.

Finalmente, agradecer a cada una de las personas que me marcaron en estos 8 años en la Universidad, que aunque no los haya nombrado aquí siempre tendrán un espacio especial en mis recuerdos de este proceso que costó, pero se logró.

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	
2. MARCO TEÓRICO.....	1
2.1 Introducción .....	1
2.2 Caries .....	1
2.3 Probióticos .....	4
2.3.1 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG .....	5
2.4 Prebióticos .....	6
2.4.1 Vitamina D.....	8
2.4.2 Vitamina C.....	9
2.5 Simbióticos.....	9
2.6 Modelo de caries <i>in vitro</i> .....	10
2.7 Evaluación de microdureza superficial .....	11
2.8 Planteamiento del problema .....	12
3. HIPÓTESIS .....	13
4. OBJETIVO GENERAL.....	13
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
6. METODOLOGÍA .....	14
6.1 Obtención de la muestra.....	14
6.2 Preparación de los bloques de esmalte .....	15
6.3 Montaje de las muestras .....	16
6.4 Preparación de medios y reactivos .....	17
6.5 Estudios de viabilidad y co-cultivo .....	17
6.6 Obtención y procesamiento de muestra de saliva .....	19



6.7 Formación de biopelícula de <i>S. mutans</i> .....	20
6.8 Proceso de desmineralización .....	22
6.9 Análisis de viabilidad y pureza de los cultivos.....	25
6.10 Acidogenicidad de la biopelícula .....	26
6.11 Remoción de la biopelícula y almacenamiento de las muestras ..	26
6.12 Medición de microdureza superficial de Vickers.....	27
6.13 Análisis estadístico de valores de dureza superficial.....	28
7. RESULTADOS.....	30
7.1 Estudios de viabilidad y co-cultivo .....	30
7.2 Formación de biopelícula en el esmalte y crecimiento bacteriano	32
7.3 Análisis de viabilidad y pureza de los cultivos.....	33
7.4 Mediciones de pH .....	36
7.5 Resultados de microdureza superficial de Vickers .....	37
8. DISCUSIÓN.....	38
9. CONCLUSIONES.....	44
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
11. ANEXOS Y APÉNDICES .....	58

## 1. RESUMEN

**Introducción:** La caries dental es una enfermedad crónica multifactorial mediada por bacterias que afecta a una gran parte de la población mundial. Los tratamientos convencionales suelen abordar solo los signos clínicos, mientras que en la odontología mínimamente invasiva se apuesta por un tratamiento preventivo de las lesiones. Dentro de estos tratamientos se han estudiado el uso tanto de probióticos como de prebióticos, de forma separada, para restaurar el equilibrio del microbioma oral. Cuando los probióticos actúan de forma conjunta con prebióticos se denomina simbióticos, los cuales han demostrado tener un mayor efecto sobre el individuo que las mismas sustancias por separado.

**Objetivo:** Evaluar si existen diferencias en la microdureza superficial de bloques de esmalte humano en un modelo *in vitro* de caries, comparando grupos expuestos a desmineralización con grupos tratados con simbióticos de *Lactobacillus rhamnosus* GG y vitaminas C y D.

**Metodología:** Se diseñó un modelo *in vitro* de caries utilizando bloques de esmalte humano donde se generó una biopelícula monoespecie de *Streptococcus mutans*, expuesta a sacarosa durante cinco días. Se establecieron cinco grupos para la comparación: control negativo (no expuesto), un control positivo (expuesto a sacarosa), un control probiótico (con *L. rhamnosus* GG), un grupo simbiótico con *L. rhamnosus* GG y vitamina D, y otro con *L. rhamnosus* GG y vitamina C. Tras el periodo de exposición, se evaluó el contenido mineral mediante la prueba de microdureza superficial de Vickers.

**Resultados:** La microdureza superficial de los bloques tratados con ambos simbióticos fue superior a la del grupo expuesto a sacarosa. Específicamente, el simbiótico de *L. rhamnosus* GG con vitamina C mostró diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo expuesto a sacarosa y al grupo control probiótico. En contraste, el simbiótico con vitamina D no presentó diferencias significativas respecto al grupo control probiótico.

**Conclusión:** Los simbióticos basados en *L. rhamnosus* GG y vitaminas C y D demostraron efectos inhibitorios en la desmineralización del esmalte dental, siendo el simbiótico con vitamina C el más efectivo. Sin embargo, el simbiótico con vitamina D no mostró ventajas claras sobre el uso del probiótico solo.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Introducción**

Las principales patologías orales, la enfermedad periodontal y la enfermedad de caries, han sido descritas como enfermedades crónicas no transmisibles con alta prevalencia y severidad que aumenta con la edad (James y cols., 2018). Las patologías orales son consideradas un problema de salud pública mundial debido a su alta prevalencia, su impacto negativo en la calidad de vida de los individuos y la sociedad y por su alto costo de tratamiento (Ministerio de Salud, 2019).

Las lesiones de caries no tratadas en dientes permanentes representan la condición oral más prevalente a nivel mundial y se calcula que el 2017 afectó a 2.3 billones de personas; en dientes primarios afectan al 46,9% de los niños y niñas de 1 a 4 años y al 39,3% de los niños y niñas de 5 a 9 años (Wen y cols., 2022) y representa la primera causa de dolor y pérdida dentaria (Selwitz y cols., 2007).

En Chile, según la Encuesta Nacional de Salud (ENS) del año 2017, dentro de las patologías orales la enfermedad de caries en dentición permanente representa la mayor prevalencia, seguida de la enfermedad periodontal y enfermedad de caries en dentición primaria (Ministerio de Salud, 2019).

### **2.2 Caries**

En la cavidad oral coexisten una gran variedad de microorganismos, estando presentes más de 700 taxones diferentes (Simón-Soro y Mira, 2015; Kilian y cols., 2016; Twetman, 2018), esto lo convierte en uno de los microbiomas más diversos del cuerpo humano albergando especies víricas, fúngicas, protozoarias, arqueas y bacterianas (Wade, 2013). Estas distintas especies se pueden encontrar organizadas en biopelículas en las diferentes superficies de la cavidad oral y su composición depende de las condiciones de cada microambiente (Kilian y cols., 2016). Por ejemplo, bacterias encontradas en fosas y fisuras tienden a ser anaerobios facultativos Gram positivo que metabolizan azúcares simples; por otro lado, las bacterias que se pueden encontrar en el margen gingival son

principalmente anaerobios estrictos con metabolismo proteolítico (Marsh y cols., 2015).

La presencia de múltiples y diversas especies microbianas no necesariamente produce enfermedad en el hospedero. Las bacterias consideradas patógenas también forman parte del microbioma normal en individuos sanos y coexisten en un estado de equilibrio conocido como eubiosis (Kumar y Mason, 2015; Philip y cols., 2018; Marsh, 2018). Ante ciertas situaciones que generan estrés ecológico, ese equilibrio se rompe generando una disbiosis entre el hospedero y la microbiota. Generalmente, en la cavidad oral la pérdida del equilibrio se debe a la baja del pH, debido principalmente al resultado de la fermentación de carbohidratos simples (azúcares) consumidos en la dieta por parte de microorganismos acidogénicos; aunque también puede producirse por disminución del flujo salival, ya que esta presenta una capacidad *buffer* que neutraliza los ácidos resultantes de la fermentación bacteriana; y/o por la falta de remoción mecánica de la biopelícula durante el cepillado dentario. La baja del pH fomenta la desmineralización de la estructura dentaria (Kumar y Mason, 2015; Kilian y cols., 2016; Pitts y cols., 2021) y el crecimiento de bacterias acidúricas, en desmedro de las bacterias comensales, potenciando así la mantención del desequilibrio (Marsh y cols., 2015).

La caries dental consiste en la destrucción localizada de tejido duro susceptible por productos ácidos generados por la fermentación de carbohidratos simples de la alimentación. Se puede presentar en la corona del diente y en la raíz, pudiendo afectar al esmalte, al cemento y a la dentina. Los signos clínicos de la desmineralización de los tejidos, las lesiones de caries, son visibles en etapas más avanzadas de la caries dental, pero las primeras etapas de este proceso no son detectables ni clínica ni radiográficamente. Este proceso biológico es iniciado por la biopelícula que recubre la superficie dental (Selwitz y cols., 2007). En esta biopelícula se produce un cambio ecológico patológico por bacterias acidogénicas/acidúricas, creando microambientes ácidos y resultando en la desmineralización de tejidos duros (Marsh, 2018). Mientras este desbalance se mantenga se favorecerán las condiciones que potencien el desarrollo de la caries

dental, por lo que los individuos presentarán un microbioma menos diverso que individuos sanos, con predominancia de microorganismos cariogénicos (Kanasi y cols., 2010).

Antiguamente la enfermedad de caries era considerada una enfermedad infectocontagiosa, sin embargo, con esta nueva perspectiva ecológica, hoy es considerada por la Federación Dental Internacional (FDI) como una enfermedad crónica no transmisible mediada por biopelículas bacterianas (Twetman, 2018; Pitts y cols., 2021). Se encuentra asociada a factores socioeconómicos y al resultado de la interacción entre factores genéticos, fisiológicos, ambientales/conductuales y las bacterias acidogénicas/acidúricas del microbioma oral (Philip y cols., 2018).

El tratamiento tradicional para abordar la caries dental se basaba en la eliminación de los microorganismos para así prevenir la recurrencia de la infección (Yu y cols., 2021). Para esto se realizaba la eliminación total de la lesión de caries para realizar tratamientos restauradores y/o rehabilitadores; sin embargo, esto no representa una solución a largo plazo, puesto que al no tratar los factores etiológicos de la enfermedad de caries se presenta una mayor reincidencia de las lesiones de caries, necesitando retratar aquellos dientes ya restaurados y eliminando mayor cantidad de tejido dentario (Frencken, 2017; Schwendicke, 2019). Con el nuevo paradigma sobre la enfermedad de caries se ha planteado un enfoque mínimamente invasivo que apunta principalmente a la prevención de la enfermedad. Dentro de sus principales terapias se encuentra el adecuado control mecánico de la biopelícula, el uso de fluoruros, la modificación de conductas alimentarias y la modulación de la microbiota oral mediante el uso de agentes antisépticos orales y el uso de prebióticos y probióticos (Glenn y Glenn, 1994; Twetman, 2018).

La modulación del microbioma busca mantener un equilibrio entre el hospedero y los microorganismos de la cavidad oral. Los tratamientos con agentes antisépticos presentan un mecanismo de acción no selectivo, por lo tanto, afectan tanto a microorganismos potencialmente patógenos como a aquellos que presentan una relación comensal. Esto genera un desbalance en el microbioma permitiendo la colonización de microorganismos oportunistas (Glenn y Glenn, 1994). Debido a la

ineficiencia de los agentes antisépticos para modular la microbiota es que surge el uso de probióticos y prebióticos, ya que al adicionar cepas bacterianas específicas estas son capaces de modular el ambiente de forma selectiva, promoviendo un estado de eubiosis (Sanders, 2008; Twetman y Jørgensen, 2021).

### 2.3 Probióticos

Los probióticos fueron definidos en 2002 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y por la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura (FAO) como “microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren efectos beneficiosos al hospedero” (Food y cols., 2006). Por su parte en 2014 la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP) los definió como “miembro(s) de una especie segura, en donde hay evidencia suficiente de un efecto benéfico general en humanos; o microorganismos con una propiedad (estructural, una actividad o subproducto) para el cual existe suficiente evidencia de un efecto beneficioso general en humanos” (Hill y cols., 2014). La palabra probiótico viene del griego “*Pro*” y “*Biotos*” que significan, literalmente, “a favor de la vida”. El término probiótico fue acuñado en 1954 por Ferdinand Vergin en su artículo “*Anti-und Probiotika*” donde describe el efecto nocivo del uso de antibióticos y otros agentes antimicrobianos en la microbiota intestinal y los compara con los efectos beneficiosos de ciertas bacterias, las cuales denomina “*probiotika*” (Markowiak y Śliżewska, 2017).

Se han descrito múltiples beneficios de los probióticos en el área de la salud, siendo principalmente estudiados sus usos en el tratamiento de enfermedades disbióticas como enfermedades gastrointestinales, respiratorias, urogenitales, alergias, intolerancia a la lactosa e incluso cáncer y sus efectos colaterales (Sanders, 2008; Sánchez y cols., 2015). Estos beneficios se producen principalmente a través de la modulación de la microbiota del hospedero de forma positiva reduciendo la presencia de bacterias patógenas y de sus compuestos tóxicos (Yadav y cols., 2022). Para ello cuentan con diversos mecanismos de acción, principalmente descritos en las enfermedades intestinales, entre los cuales se destacan cuatro: El antagonismo a través de la producción de sustancias

antimicrobianas; la competición con microorganismos patógenos por la adhesión al epitelio y nutrientes; la inmunomodulación del hospedero; y la inhibición de la producción de toxinas bacterianas (Devine y Marsh, 2009; Markowiak y Śliżewska, 2017; Yadav y cols., 2022).

En salud oral se ha investigado el uso de probióticos principalmente para el tratamiento y prevención de la enfermedad periodontal y caries, esto debido a que ambas son enfermedades originadas por un cambio en el equilibrio del microbioma (Haukioja, 2010; Saha y cols., 2012; Twetman y cols., 2017). El uso de probióticos en ambas enfermedades ha demostrado ser capaz de restaurar el equilibrio de microorganismos y reducir el recuento de *S. mutans* tanto en las biopelículas como en saliva (Inchingolo y cols., 2022).

Para el tratamiento y prevención de caries se ha estudiado el uso de diversos probióticos, principalmente *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* y *Bifidobacterium animalis*, siendo el primero de estos el que cuenta con mayor evidencia disponible.

### **2.3.1 *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG**

*L. rhamnosus* es un microorganismo del género *Lacticaseibacillus* que se caracteriza por ser Gram positivo, microaerófilo y productor de ácido láctico como producto de la fermentación de azúcares (Zheng y cols., 2020; Zúñiga y cols., 2021). Se han estudiado ampliamente sus usos como probiótico en la mucosa intestinal debido a sus mecanismos de acción, tales como la producción de compuestos antimicrobianos, la regulación de la homeostasis estabilizando la función de la barrera intestinal, la modulación de la respuesta inmune sistémica y la exclusión competitiva por sitios de adhesión y nutrientes (Shi y cols., 2020). En 2023, Fan demostró, en un estudio realizado en el Laboratorio de Bioquímica Oral de La Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, la capacidad de *L. rhamnosus* GG (LGG) de secretar bacteriocinas capaces de actuar de manera sinérgica para ejercer un efecto inhibitorio en el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (Fan W., 2023)



Respecto a sus usos en la cavidad oral para la prevención de la caries dental se han realizado múltiples estudios tanto en población infantil como en adultos incorporando el probiótico en alimentos. La gran mayoría utilizó como indicador el recuento de *S. mutans* (Haukioja, 2010; Cagetti y cols., 2013; Laleman y cols., 2014; Coqueiro y cols., 2018), y el resto de los estudios utilizaron como indicador el desarrollo de lesiones de caries (Hasslöf y Stecksén-Blicks, 2020).

En 2001 Näse administró leche suplementada con LGG en niños de 1 a 6 años obteniendo una disminución significativa del riesgo cariogénico (Näse y cols., 2001). En 2009, Stecksén administró *L. rhamnosus* LB21 en leche suplementada con flúor, mostrando una disminución de la prevalencia e incidencia de caries; lamentablemente, en este estudio no es posible establecer el efecto de *L. rhamnosus* debido a la presencia del flúor en la leche (Stecksén-Blicks y cols., 2009). Por otro lado, en 2016, Rodríguez y cols. realizaron un ensayo clínico en niños de 2 y 3 años donde se administró leche suplementada con *L. rhamnosus* SP1, obteniendo una menor incidencia en las lesiones de caries, corroborando así los resultados obtenidos por Näse (Rodríguez y cols., 2016).

Por otro lado, Wattanarat en 2015 utilizó los niveles de péptido de neutrófilos humanos (HNP1-3) en saliva como indicador, la cual es una molécula catiónica presente en saliva que tiene propiedades antimicrobianas y se ha visto asociada a sujetos libres de caries. Al administrar leche suplementada con *Lactobacillus paracasei* SD1 a niños observó que el grupo suplementado con probióticos presentaba disminución del recuento de *S. mutans* y una reducción en la incidencia de caries (Wattanarat y cols., 2015).

## **2.4 Prebióticos**

En 2010, los prebióticos fueron definidos por Gibson como aquellos “ingredientes fermentados selectivamente que dan como resultado cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal, lo que confiere beneficios a la salud del hospedero”. Estos sustratos seleccionados por los microorganismos son generalmente carbohidratos de cadena corta que escapan de

la digestión quedando disponibles para ser utilizados (Gibson y cols., 2010). En 2016, La ISAPP actualizó la definición de prebióticos a “sustrato utilizado selectivamente por los microorganismos del hospedero otorgando un beneficio a su salud”. Esta nueva definición expande el concepto de prebióticos para incluir sustancias que no sean carbohidratos y para abarcar otras partes del cuerpo que no pertenezcan al tracto gastrointestinal (Gibson y cols., 2017). Los prebióticos se diferencian de otras sustancias puesto que optimizan el metabolismo de ciertos microorganismos y favorecen el crecimiento de bacterias beneficiosas para mantener un estado de salud.

La mayoría de los prebióticos utilizados en humanos han demostrado estimular *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.* específicamente, pero no a microorganismos patógenos como *Escherichia coli* o *Clostridium spp.* (Roberfroid y cols., 2010).

Además de los beneficios que traen al favorecer el crecimiento de la microbiota, se postula que también estimulan el sistema inmune, razón por la cual se plantea su uso para el tratamiento de infecciones microbianas (Yadav y cols., 2022) y también para la prevención de la destrucción causada por enfermedades autoinmunes (Sohail y cols., 2016; Li y cols., 2020).

Sus usos se han descrito en múltiples áreas de la medicina para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, depresión, mejoramiento de sistema inmune, enfermedades dermatológicas, enfermedades cardíacas, entre otras (Slavin, 2013). Respecto a sus usos en salud oral, el prebiótico mayormente descrito es la arginina, cuyo mecanismo de acción se basa en la modulación del pH de la boca y supresión de la pérdida mineral de los tejidos duros del diente (Bijle y cols., 2021; Pørksen y cols., 2023); pero también se han descrito el uso de D-Tagatosa (Mayumi y cols., 2021), Xilitol (Söderling y Pienihäkkinen, 2020) y nitratos (Feng y cols., 2023).

### 2.4.1 Vitamina D

La vitamina D es un esteroide liposoluble cuya principal función descrita es la regulación del balance calcio-fósforo, sin embargo, también se le atribuyen funciones en la respuesta inmune, en la diferenciación celular, en la regulación del metabolismo de carbohidratos, entre otras (Botelho y cols., 2020). Respecto a su función en la respuesta inmune la vitamina D aumenta la producción de péptidos antimicrobianos, específicamente beta defensinas y catelicidinas, por parte de los macrófagos (Yamamoto y Jørgensen, 2019). Esto toma relevancia específicamente en el tracto gastrointestinal donde se ha visto que ha mejorado la microbiota (Shang y Sun, 2017); allí además participaría en la regulación de la inflamación y mantención de la barrera intestinal (Waterhouse y cols., 2019).

Por su participación con la microbiota intestinal se ha planteado el uso de vitamina D y probióticos en conjunto para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales donde se ha observado una relación entre ambos. Incluso se ha postulado que los probióticos podrían tener un efecto sinérgico al aumentar la expresión de su receptor de membrana, el receptor VDR (Shang y Sun, 2017).

Respecto a su actividad en la prevención de caries existe poca evidencia en la literatura. Principalmente se le atribuye influencia en la respuesta inmune favoreciendo la liberación de péptidos antibacteriales por medio de la activación de receptores de membrana en polimorfonuclear neutrófilos (Wang y cols., 2013; Botelho y cols., 2020).

Se han realizado estudios evaluando los niveles séricos de vitamina D y el riesgo de caries en distintas poblaciones donde se han obtenido resultados variables. Ciertos autores le atribuyen las diferencias en los resultados a factores que influyen en la absorción de la vitamina D, tales como exposición al sol, ubicación geográfica y estación del año en el cual fueron tomadas las muestras (Hujoel, 2013; Hussein y cols., 2021; Rigo y cols., 2023).

No se ha descrito una interacción entre *L. rhamnosus* y vitamina D en enfermedades de la cavidad oral, y existe escasa evidencia de una relación

sinérgica en enfermedades gastrointestinales y osteoporosis (Cheng y cols., 2022; Chen y cols., 2023).

### **2.4.2 Vitamina C**

La vitamina C o ácido ascórbico, es un carbohidrato simple soluble que actúa como agente antioxidante eliminando radicales libres y como cofactor enzimático de más de 15 enzimas, haciéndola vital para la mantención de la salud general del cuerpo humano (Padayatty y cols., 2003; Padayatty y Levine, 2016). La vitamina C promueve la absorción de iones de hierro, participa en la síntesis de colágeno, de hormonas y de carnitina, además de jugar un rol en la función y regulación de la respuesta inmune (Doseděl y cols., 2021). Hay evidencias de que el consumo de vitamina C genera efectos moduladores positivos para la microbiota intestinal al favorecer la diversidad de los microorganismos (Li y cols., 2023), de esta forma mejora la morfología intestinal y reduce la inflamación intestinal (Li y cols., 2021).

En boca, la vitamina C se acumula en tejido glandular salival, pero las concentraciones que alcanzan son menores que las concentraciones en sangre. Su función en la saliva es aún desconocida (Padayatty y Levine, 2016).

En salud oral está ampliamente descrita su influencia en la enfermedad periodontal (Tada y Miura, 2019) y el cáncer oral (Wang y cols., 2022). Existe escasa evidencia sobre su participación en la prevención de la enfermedad de caries y los resultados obtenidos no han sido concluyentes (Hu y cols., 2022).

Por otro lado, existe evidencia de que LGG sería capaz de catabolizar el ácido ascórbico en condiciones de anaerobiosis, pero se requieren más estudios para establecer esta relación (Linares y cols., 2011).

### **2.5 Simbióticos**

Los simbióticos son la mezcla de prebióticos y probióticos, en donde las bacterias probióticas utilizan los prebióticos como sustrato para su crecimiento. Existen dos tipos: los complementarios y los sinérgicos. Los simbióticos complementarios son aquellos en los cuales los probióticos y los prebióticos juntos

generan beneficios de salud, pero no requieren funcionar en conjunto; en cambio, los simbióticos sinérgicos contienen sustratos que son utilizados por el microorganismo probiótico para favorecer su crecimiento (Swanson y cols., 2020).

Se han combinado los prebióticos y probióticos buscando que tengan acciones complementarias que prolonguen sus efectos beneficiosos, favoreciendo el crecimiento y supervivencia de la microbiota oral asociada a salud (Bijle y cols., 2021). Los simbióticos tienen mejores resultados que los probióticos y prebióticos por si solos (Li y cols., 2020).

Respecto al uso de simbióticos para el tratamiento de afecciones de la cavidad oral, la evidencia es variada pero limitada, principalmente describiendo sus usos en terapias de secuelas de cáncer y en enfermedades periodontales. Existe escasa evidencia del uso de simbióticos para el tratamiento de la enfermedad de caries, en donde los estudios descritos están enfocados principalmente en el uso de arginina como prebiótico (Pørksen y cols., 2023).

## **2.6 Modelo de caries *in vitro*.**

El uso de modelos de caries *in vitro* nos permite estudiar de forma separada las distintas variables que influyen en el proceso de formación de lesiones de caries, controlando cada aspecto por separado (Zero, 1995).

El modelo de caries *in vitro* planteado y validado por Ccahuana-Vásquez y Cury en 2010, tiene la particularidad que utiliza sustrato dentario como esmalte para la evaluación de desmineralización; además, las exposiciones con sacarosa se realizan en periodos de “festín y hambre” simulando la exposición real a carbohidratos y las disminuciones de pH que se producen en la cavidad oral asociadas a las ingestas de alimentos. Esto lo diferencia de otros modelos en los cuales *S. mutans* se encuentra expuesto constantemente a sacarosa, y por lo tanto está en constante estrés ácido (Ccahuana-Vásquez y Cury, 2010).

## 2.7 Evaluación de microdureza superficial

La dureza representa la resistencia de un cuerpo a rayones y/o a la deformación local. Para evaluarla existen las pruebas de dureza, que buscan medir la resistencia a la penetración de la superficie mediante la indentación de un objeto duro (Askeland y Wright, 2016), donde a mayor extensión o profundidad de la marca menor es la dureza de la superficie del objeto (Callister y Rethwisch, 2018).

Existen varias pruebas para evaluar la dureza superficial, dependiendo de la carga necesaria a aplicar y del material con el que se realiza la indentación. Para la evaluación de la dureza superficial de superficies microscópicas se recomienda la prueba de microdureza superficial de Vickers (HV) que se realiza utilizando un microdurómetro. Para realizarla se ajustan los parámetros de tiempo y fuerza (F) con las cuales se realizará la prueba, luego se coloca la muestra en la plataforma, se ajusta con el lente del microdurómetro hasta que la superficie se observe nítidamente y se realizan las indentaciones con un diamante piramidal. Una vez realizada la indentación se miden las longitudes de las diagonales del rombo resultante (d) en mm y se aplica la ecuación de microdureza de Vickers:

$$HV = \frac{1.8544 \times F}{d^2}$$

**HV:** Dureza de Vickers

**F:** Fuerza aplicada

**d<sup>2</sup>:** producto de las diagonales

La microdureza superficial permite medir objetivamente los cambios estructurales de la superficie mineral del esmalte que se producen en los modelos de caries in vitro al aplicarles una carga. Esta prueba es sensible y reproducible para estudiar etapas tempranas en la desmineralización del esmalte (Zero y cols., 1992; Zero, 1995). Además, ha sido utilizado como prueba en diversos estudios donde se ha sometido esmalte a modelos de desmineralización-reminerización (Padilla, 2018; Naveillán, 2020; Tobar, 2022) y para evaluar tejido dentario sometido a agentes desmineralizadores (Collys y cols., 1992).

## 2.8 Planteamiento del problema

Entendiendo la enfermedad de caries como un problema de salud pública que afecta a gran parte de la población y sus consecuencias biológicas al no ser tratada y/o controlada, representando un alto costo para las personas, es que se hace necesario buscar alternativas de tratamiento y prevención de las lesiones de caries.

Algunos de los nuevos tratamientos propuestos por la odontología mínimamente invasiva se enfocan principalmente en devolver el equilibrio al ecosistema oral, perdido durante periodos de alta acidez y mal control microbiológico. Estos tratamientos han utilizado probióticos, demostrando su capacidad para recuperar el equilibrio mediante colonización y competición por recursos, liberación de sustancias antimicrobianas, modulación de la respuesta inmune, entre otros mecanismos de acción; y también prebióticos, generando un ambiente más básico o siendo utilizados como nutrientes para ciertos microorganismos beneficiosos para la salud. Sin embargo, hay pocos estudios que aborden el uso de probióticos y prebióticos en conjunto, como simbióticos, para la prevención de las lesiones de caries en estadio temprano.

Es por ello que nos hemos planteado la siguiente pregunta de investigación: ¿Puede el uso de simbióticos de *L. rhamnosus* con vitamina C y *L. rhamnosus* con vitamina D en un modelo de caries *in vitro* generar mayores valores de microdureza superficial comparado con los grupos control?

### **3. HIPÓTESIS**

El uso de simbióticos de *L. rhamnosus* con vitamina C y *L. rhamnosus* con vitamina D en un modelo de caries *in vitro* genera mayores valores de microdureza superficial comparado con los grupos control.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Establecer las diferencias en microdureza superficial en bloques de esmalte en un modelo *in vitro* de caries al administrar simbióticos de *L. rhamnosus* con vitamina C y *L. rhamnosus* con vitamina D comparado con los grupos control.

### **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la microdureza superficial de bloques de esmalte que se les administran simbióticos de *L. rhamnosus* y vitamina C y de *L. rhamnosus* y vitamina D en un modelo *in vitro* de caries.
- Determinar la microdureza superficial de bloques de esmalte de los grupos control.
- Comparar la microdureza superficial de los bloques de esmalte de los grupos experimentales y los grupos control.



## 6. METODOLOGÍA

Este es un estudio experimental *in vitro* donde se utilizó una versión adaptada del modelo de biopelícula descrito por Ccahuana-Vásquez y Cury (2010) en el cual se simula un ambiente cariogénico mediante la exposición de bloques de esmalte humano a sacarosa 10% de forma controlada previa formación de biopelícula monoespecie de *S. mutans*. Estos bloques fueron expuestos a inmersiones de sacarosa 10% 4 veces al día por 5 días seguidos simulando las ingestas diarias de alimento. Se determinaron 3 grupos control y 2 grupos experimentales. El grupo control negativo no fue expuesto en ningún momento ni a sacarosa, ni a probióticos ni a simbióticos. El grupo control positivo solo fue expuesto a sacarosa 10%. El grupo control probiótico que expuesto al probiótico LGG Vivera®, (Merck) de manera tópica, mediante goteo, luego de la primera exposición diaria a sacarosa. Los grupos experimentales 1 y 2 fueron expuestos al simbiótico Munogotas® (Axon), cuya composición corresponde a LGG con vitamina D (LGGvitD) y Daily Biotic Flora® (VitaminLife) cuya composición es de LGG con vitamina C (LGGvitC), respectivamente. Los bloques de esmalte fueron evaluados a través de la prueba de dureza de Vickers posterior al proceso desmineralizante.

### 6.1 Obtención de la muestra

Para el cálculo del tamaño muestral se tomó en cuenta la variable primaria del estudio, la microdureza superficial. Para ello se consideraron los siguientes aspectos: Riesgo alfa de 0,05 y un riesgo beta de 0,2 en un contraste unilateral, una desviación estándar de 21,4, estimando una tasa de pérdida de seguimiento de 5%, por lo cual se necesitan 10 muestras para cada grupo resultando en un total muestral de 50 muestras.

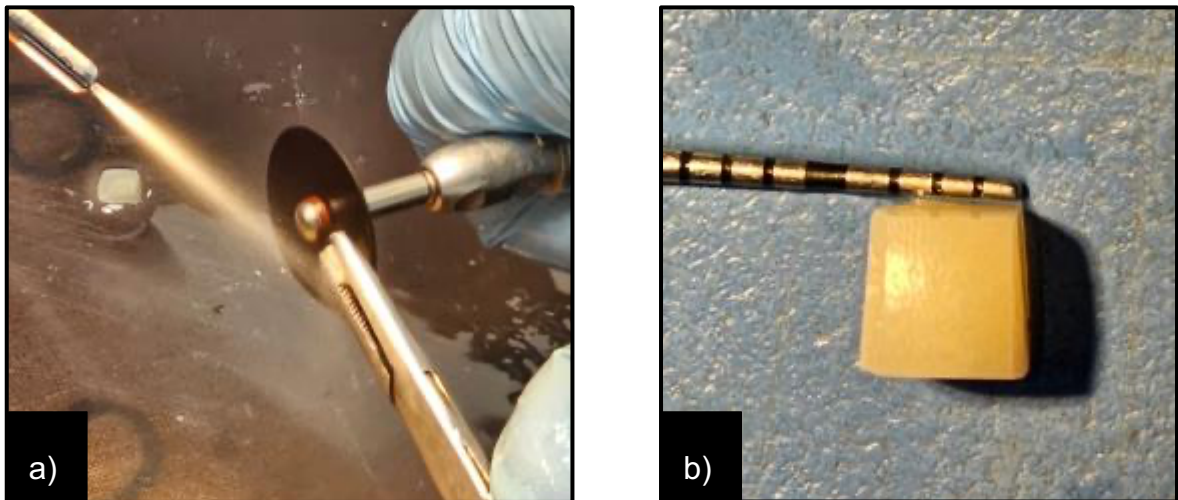
Las muestras fueron obtenidas de terceros molares incluidos extraídos por indicación de ortodoncia los cuales fueron donados de forma voluntaria por pacientes del “Instituto Nacional de Ortodoncia”. Los donantes firmaron un consentimiento informado autorizado por el comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo nº1). Los terceros molares fueron

evaluados de forma individual para descartar todos aquellos que presentaran defectos del esmalte, fracturas o zonas desmineralizadas. Los dientes seleccionados fueron sumergidos en una solución de Timol 2% y refrigerados a 5°C hasta el momento de su uso.

Se realizó la eliminación de tejido periodontal con instrumental manual de periodoncia, Jackets y curetas Gracey. Posteriormente fueron almacenados en Timol 2% y refrigerados a 5°C.

## **6.2 Preparación de los bloques de esmalte**

Se realizaron cortes en las caras distal y mesial de los terceros molares con instrumental rotatorio de alta velocidad con forma de aguja de grano azul (ISO 806.314.166.524.012) siempre con abundante irrigación (Figura 1a). Una vez obtenidas las caras menos convexas se realizaron desgastes utilizando instrumental de baja velocidad y disco de carburo de silicio (carburundum) e irrigación constante, hasta obtener bloques de esmalte de 3x3x3 mm (Figura 1b). Estos bloques fueron almacenados en tubos centrífuga de 2 mL, rotulados y conservados refrigerados a 5°C hasta su utilización. Previo al montaje se realizó una inspección visual de todas las muestras para descartar aquellas que presentaran daños estructurales o defectos del esmalte.

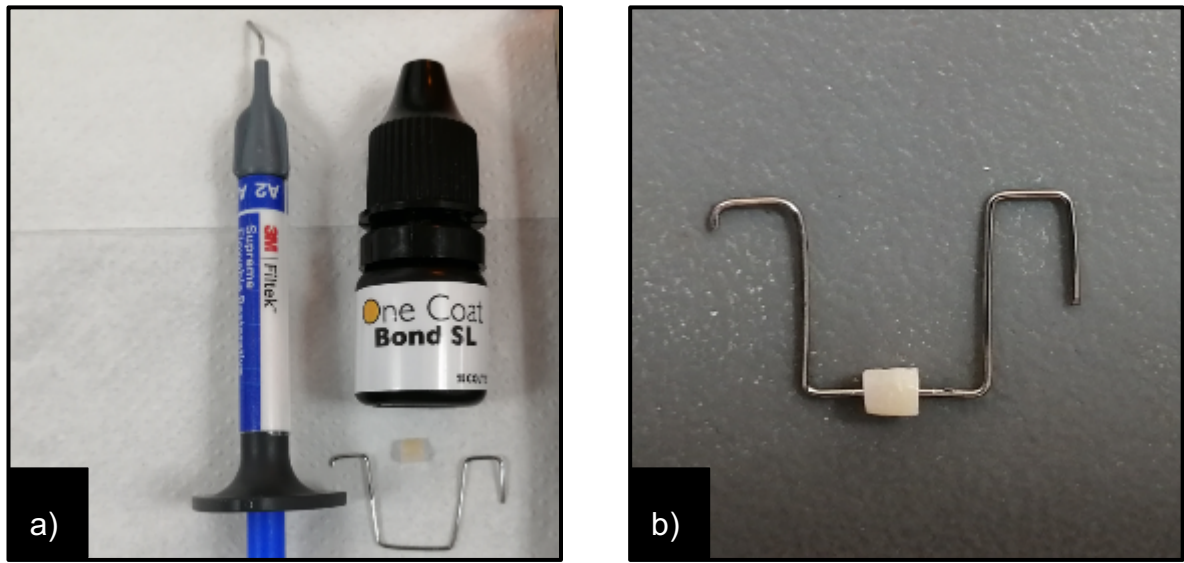


**Figura 1: Corte de bloques de esmalte.** a) Corte y rectificación de muestras con baja velocidad y abundante irrigación. b) Medida estándar de bloques de esmalte. Imágenes obtenidas en coautoría con Valerio, 2023.

### 6.3 Montaje de las muestras

Se confeccionó un armazón de alambre de ortodoncia de 0,8 mm de diámetro para cada bloque de esmalte para así poder mantener suspendidos los bloques en sus pocillos de polietileno de cultivo respectivos. Los bloques fueron adheridos al armazón por la cara dentinaria utilizando adhesivo universal (One Coat Bond SL™, Coltene) y resina compuesta fluida (Filtek™ Supreme Flowable, 3M™), esto fue realizado en el laboratorio preclínico de la FOUCh. No se realizó grabado ácido de la superficie con la finalidad de no perjudicar la estructura del esmalte (Figura 2a y 2b).

Una vez montados los bloques de esmalte en sus armazones, estos fueron depositados en tubos centrífuga rotulados de 50 mL con 20 mL de agua destilada estéril. De esta forma fueron esterilizados en autoclave a 120°C por 20 min y almacenados hasta su utilización.



**Figura 2: Montaje de muestras.** a) Materiales usados para el montaje de las muestras. b) Bloque de esmalte montado en armazón metálico. Imágenes obtenidas en coautoría con Valerio, 2023.

#### 6.4 Preparación de medios y reactivos

Para las siguientes etapas del estudio fue necesaria la preparación de distintos medios de cultivo. Se prepararon agar TYCS (Tripton, Levadura, Cisteína y Sacarosa) y MRS; caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI por sus siglas en inglés *Brain Heart Infusion*), caldo BHI con glucosa 0.1 mM (BHI+G) y sacarosa 10%. Fueron esterilizados en autoclave para luego ser dispensados en placas petri, en el caso de los agares TYCS y MRS, al interior de una campana de flujo laminar, con la finalidad de disminuir el riesgo de contaminación. También se dispensaron volúmenes de agua destilada y suero fisiológico estéril.

#### 6.5 Estudios de viabilidad y co-cultivo

Para el inicio de la fase experimental primero se realizaron estudios de viabilidad para comprobar la capacidad de LGGvitD ( $4,95 \times 10^9$  UFC) y de LGGvitC ( $5 \times 10^9$  UFC) de proliferar en placa observándose crecimiento en forma de colonias.

Al encontrarse el simbiótico Daily Biotic Flora® liofilizado se debió realizar previamente la preparación del mismo según las indicaciones del fabricante,

disolviendo 1 sobre en 200 mL de agua. De esta preparación se extrajeron 100  $\mu$ L para ser sembrados en césped en agar MRS, medio selectivo para el crecimiento de *Lacticaseibacillus rhamnosus*. Además, se sembraron 100  $\mu$ L en 3 mL de caldo BHI. En el caso del simbiótico Munogotas®, debido a su presentación comercial líquida, se sembraron en césped 9 gotas, según la indicación de consumo del fabricante, en agar MRS.

Las muestras fueron incubadas en condiciones de microaerofilia a 37°C por 24 horas. Transcurridas el tiempo y evidenciado el crecimiento de colonias se procedió a realizar el estudio de co-cultivo.

No se realizó el estudio de viabilidad del probiótico Vivera®, ya que la capacidad de este probiótico de formar colonias en los medios seleccionados fue probada en el estudio realizado por Valerio en 2023 en el Laboratorio de Microbiología e Inmunología Oral (LabMIO) de La Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Para el estudio de co-cultivo se utilizó la cepa de *S. mutans* ATCC 25175 del LabMIO (cepario de la Dra. Patricia Palma F.) de la FOUCh. Desde un cultivo de *S. mutans* criopreservado en glicerol 100% a -80°C se extrajeron 100  $\mu$ L que se sembraron en agar TYCS, ya que este es un medio selectivo para *S. mutans*, y se incubó durante 24 horas en condiciones de microaerofilia a 37°C. Transcurrido dicho tiempo se realizó una inspección macroscópica y microscópica para confirmar la presencia de colonias y la pureza de este crecimiento. Se traspasaron colonias a 3mL de caldo BHI que se incubó nuevamente en ambiente microaerófilo durante 24 horas. Paralelamente, se realizó el cultivo en caldo de LGGvitD y LGGvitC. Para ello se traspasaron colonias obtenidas en el estudio de viabilidad a 3 mL de caldo BHI, cada una en su tubo correspondiente. Posteriormente se incubaron en ambiente microaerófilo por 24 horas.

Transcurridas las 24 horas y evidenciado el crecimiento bacteriano en el caldo tanto de *S. mutans* y como de LGG en sus tubos respectivos, los cultivos fueron igualados en turbidez mediante espectrofotometría utilizando el

espectrofotómetro UV-VIS de haz dividido Halo RB-10 (Dynamica, Australia) a una longitud de onda de 600 nm. Las muestras se fueron ajustando agregando caldo BHI estéril el cual fue usado como blanco, hasta obtener un valor de absorbancia de 0,125.

Una vez igualados en turbidez todos los inóculos, se sembraron 100  $\mu$ L del caldo de *S. mutans* y 100  $\mu$ L del caldo de LGGvitD en 3 mL de caldo BHI estéril (tubo 1); y 100  $\mu$ L de caldo de *S. mutans* y 100  $\mu$ L de caldo de LGGvitC en 3 mL de caldo BHI estéril (tubo 2) y se incubaron en condiciones de microaerofilia por 24 horas. Transcurrido el tiempo se realizó la homogenización de los cultivos mediante uso de vórtex y se realizó la siembra en césped en agar TYCS y agar MRS para evidenciar la presencia de LGG y *S. mutans* en sus respectivos medios selectivos. Las placas fueron incubadas durante 24 horas en condiciones de microaerofilia para posteriormente corroborar la presencia de las especies bacterianas a través de un análisis macroscópico, utilizando una lupa estereoscópica, y microscópico utilizando un microscopio óptico.

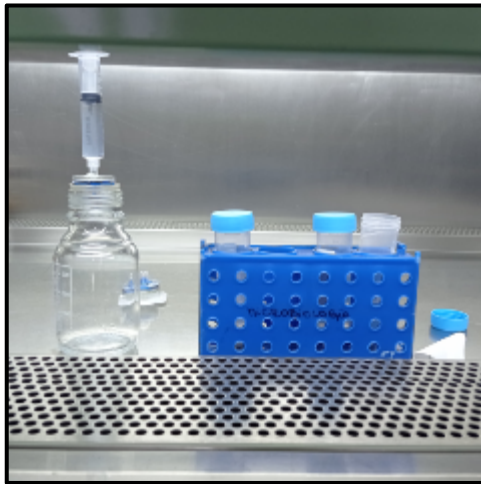
## **6.6 Obtención y procesamiento de muestra de saliva**

Para el proceso de formación de biopelícula salival en las muestras de bloques de esmalte fue necesaria la exposición por inmersión a saliva para permitir la formación de película salival adquirida. La muestra se generó a partir de un banco de saliva el cual fue donado por 3 individuos libres de caries, no fumadores, sin enfermedades sistémicas, sin consumo de antibióticos en los últimos tres meses y que no habían consumido líquidos/alimentos al menos dos horas previo a la recolección. La saliva de todos los individuos se mezcló y se trató como una sola muestra para descartar diferencias en su composición que pudieran alterar el resultado del experimento.

Se obtuvieron aproximadamente 80 mL de saliva como muestra inicial. Esta se distribuyó en tubos centrífuga de 50 mL y fueron centrifugados a 4500 rpm por 20 min a 4°C en la centrífuga Megafuge™ 8R (Heraeus™, Thermo Scientific, Alemania). Se extrajo el sobrenadante con jeringa de 20 mL y se realizó el filtrado

con filtros tipo *Syringe Filter* de 0.22  $\mu\text{L}$  EDLAB  $\text{\textcircled{R}}$  CA sobre frascos de borosilicato DURAN  $\text{\textcircled{R}}$  SCHOTT estériles. El proceso se realizó con presión manual realizando fuerza controlada sobre el émbolo de la jeringa (Figura 3). Una vez filtrado se sembraron 100  $\mu\text{L}$  en dos placas de agar sangre las cuales fueron incubadas a 37°C por 24 horas, una en condiciones de microaerofilia y la otra en condiciones de aerofilia.

Este proceso se repitió hasta que no se evidenció el crecimiento de microorganismos en las placas de agar sangre. Una vez obtenida la saliva sin presencia de microorganismos fue almacenada a 4°C hasta su utilización.



**Figura 3: Proceso de filtrado de saliva con presión manual en campana de flujo laminar.**

### **6.7 Formación de biopelícula de *S. mutans***

Para la formación de la biopelícula monoespecie de *S. mutans* se utilizó la cepa ATCC 25175 proporcionada por el LabMIO.

Se inocularon 100  $\mu\text{L}$  de *S. mutans* ATCC 25175 criopreservado en placas de agar TYCS para luego incubarlas por 24 horas a 37°C en condiciones de microaerofilia. Transcurrido el tiempo y obtenidas colonias de *S. mutans* se realizó un análisis micro y macromorfológico para confirmar la pureza del cultivo. Posteriormente se realizó la siembra de las colonias del agar en caldo BHI estéril para incubarlas a

37°C en condiciones de microaerofilia por 48 horas. Esta preparación se denominó inóculo bacteriano. Posterior a las 48 horas se ajustó el inóculo bacteriano mediante espectrofotometría, logrando una absorbancia de 0,125 en una longitud de onda de 600 nm utilizando caldo BHI estéril como blanco.

Para la formación de la película salival adquirida se utilizaron placas de polietileno de cultivo celular de 12 pocillos. En ellos se ubicaron los bloques de esmalte en sus respectivos armazones y se dispensaron 3 mL de saliva filtrada por cada pocillo. Estos se incubaron a 37°C por 30 minutos intercalando agitación manual cada 3 minutos.

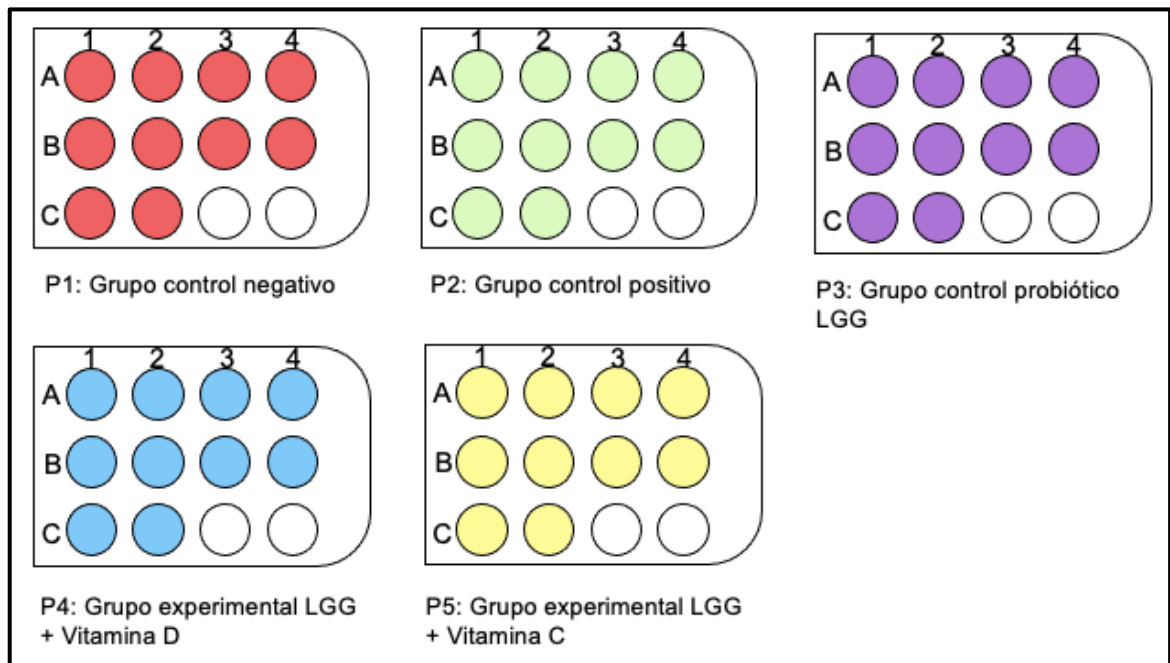
En paralelo, en un frasco estéril se realizó la preparación del caldo inicial el cual contenía:

- 125,75 mL de caldo BHI con glucosa 0,1 mM.
- 14,38 mL de sacarosa 10%.
- 6,88 mL de suspensión de *S. mutans* ajustada.

El caldo fue dispensado en las 5 placas de cultivo, utilizando solo 10 pocillos por placa. Se distribuyeron de la siguiente manera dependiendo del tratamiento desmineralizador que recibirían (Figura 4):

- P1: Grupo control negativo, no expuesto a sacarosa 10%
- P2: Grupo control positivo, expuesto a tratamiento desmineralizador
- P3: Grupo control probiótico, expuesto al probiótico Vivera® (LGG)
- P4: Grupo experimental 1 expuesto a simbiótico Munogotas® (LGGvitD)
- P5: Grupo experimental 2, expuesto a simbiótico Daily Biotic Flora® (LGGvitC)





**Figura 4: Distribución de los grupos control y experimentales en sus respectivas placas de cultivo.**

Se dispensaron 3 mL del caldo por pocillo y posteriormente se ubicaron los armazones con los bloques de esmalte con película salival adquirida formada previamente. Las placas fueron incubadas en condiciones de microaerofilia por 36 horas a 37°C.

### 6.8 Proceso de desmineralización

Para el proceso de desmineralización, las muestras del grupo control positivo (P2), control probiótico (P3) y los grupos experimentales (P4 y P5) fueron expuestas a un tratamiento por inmersión en sacarosa 10% durante 5 minutos 4 veces al día por 5 días con el fin de generar una zona de desmineralización compatible con una lesión de caries no cavitada. Los grupos experimentales además se expusieron mediante instilación a probióticos/simbióticos comerciales una vez al día. El grupo control negativo (P1) solo se sometió al cambio de caldo BHI + Glucosa 0,1 mM al inicio de la jornada. Todos los procedimientos se realizaron en campana de flujo laminar.

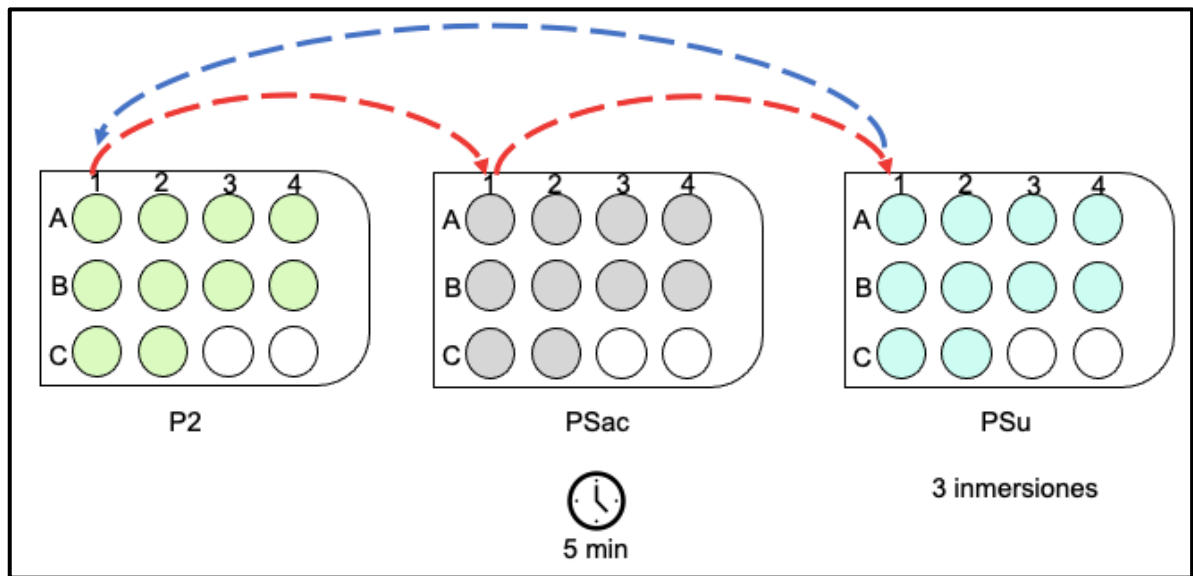
Durante la primera jornada se dispensaron 4 mL de caldo BHI + Glucosa 0,1 mM estéril en 5 nuevas placas de cultivo celular las cuales se rotularon según su grupo correspondiente. Se traspasaron las muestras de bloques de esmalte a sus nuevos pocillos con medio de cultivo fresco con el fin de mantener cepas bacterianas fisiológicamente activas.

En otras placas de cultivo celular estériles se dispensaron 4 mL de sacarosa 10% estéril (PSac) y 4 mL de NaCl 0,9% estéril (PSu). De forma paralela, se reconstituyó un sobre del probiótico Vivera® (LGG) liofilizado en un frasco estéril diluyendo el sobre liofilizado en 200 mL de suero fisiológico estéril. De la misma manera se preparó el simbiótico Daily Biotic Flora® (LGGvitC).

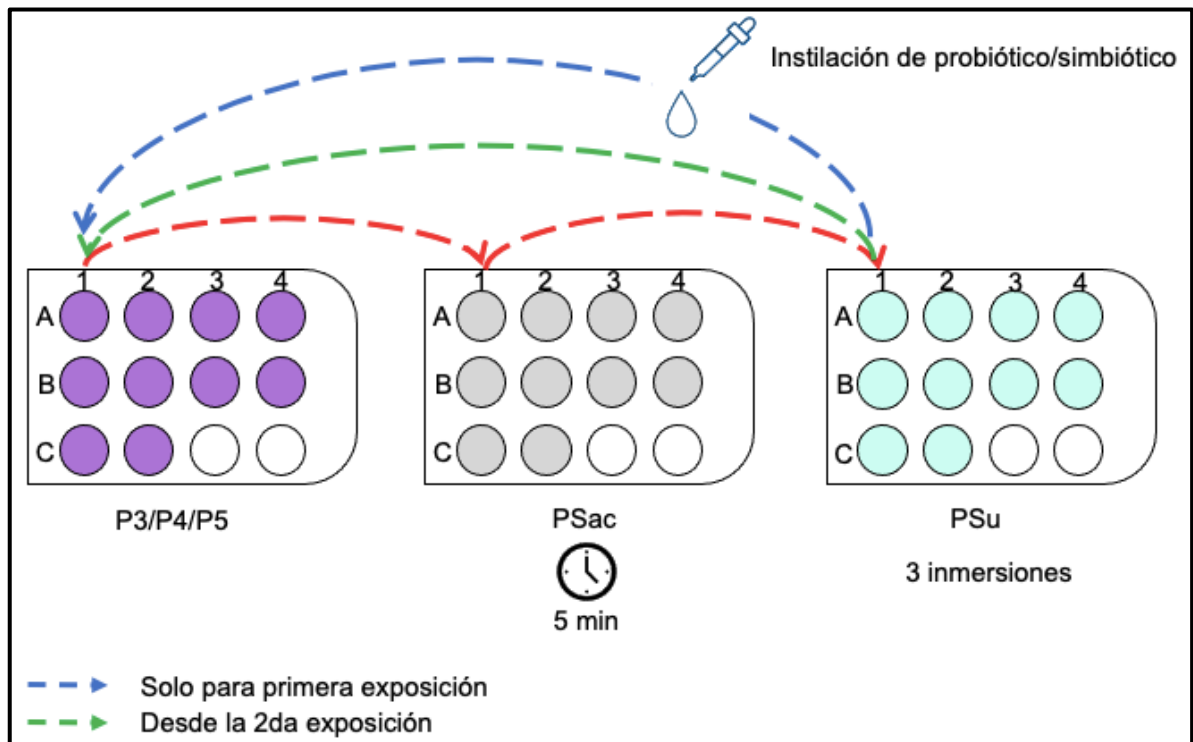
Las exposiciones se realizaron en orden de P2 a P5. Las muestras fueron traspasadas con pinzas estériles a las placas PSac por 5 minutos. Transcurrido el tiempo, cada muestra fue lavada mediante 3 inmersiones en su pocillo correspondiente en la placa PSu. En el caso del grupo P2, las muestras fueron devueltas a la placa (Figura 5). Para las muestras de P3, P4 y P5, cada muestra fue expuesta a su correspondiente probiótico/simbiótico mediante la instilación de 10 gotas en la superficie del bloque de esmalte (Figura 6). Finalmente, cada muestra fue devuelta a su placa correspondiente. Este procedimiento descrito para P3, P4 y P5 se realizó exclusivamente en la primera exposición de cada día, las siguientes exposiciones se realizaron de la misma forma descrita para P2 en todos los grupos. Las placas de cultivo se llevaron a la incubadora a 37°C en condiciones de microaerofilia luego de cada exposición.

Las placas PSac y PSu fueron retiradas, limpiadas y expuestas a luz UV por 30 minutos para su reutilización en la siguiente exposición. Al final del día ambas placas fueron desechadas para utilizar nuevas placas de cultivo estériles el día siguiente.

Este procedimiento de exposición a sacarosa 10% y lavado se realizó 4 veces al día por 5 días en horarios preestablecidos que buscaban simular los horarios de ingestas en el ser humano a lo largo del día (Figura 7).

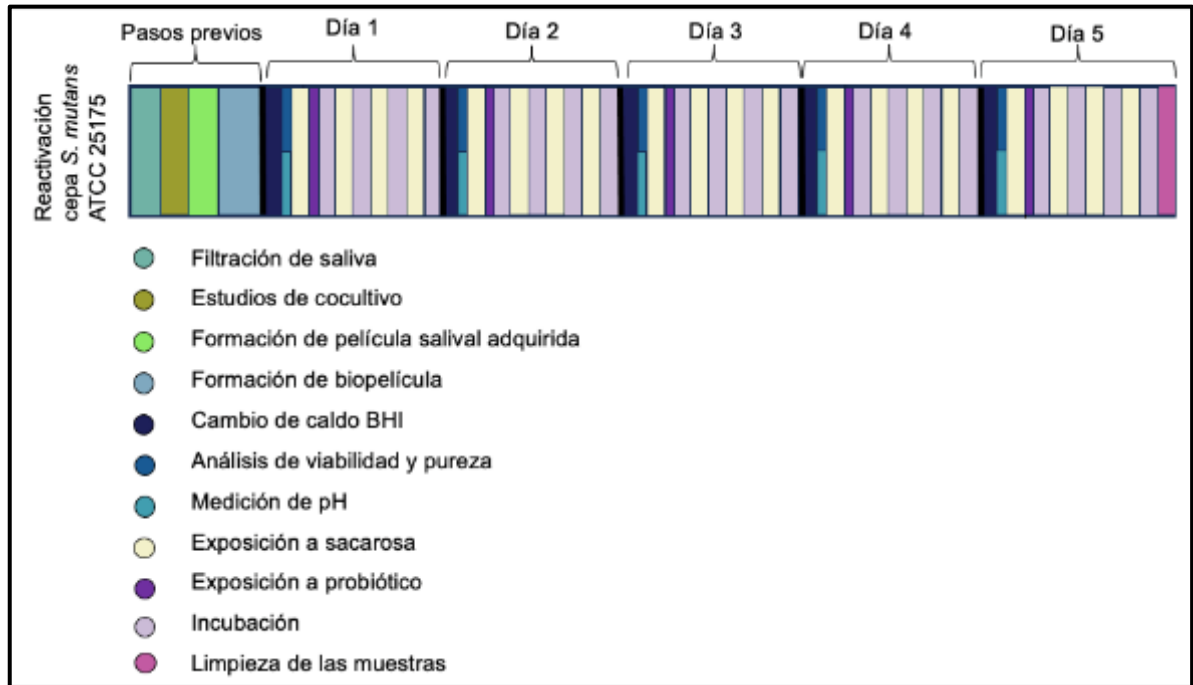


**Figura 5: Esquema de exposiciones a sacarosa 10% de P2 (grupo control positivo).**



**Figura 6: Esquema de las exposiciones a sacarosa 10% de los grupos control probiótico P3 y grupos experimentales P4 y P5. La instilación de cada grupo se realiza en relación al probiótico/simbiótico correspondiente. En el caso de P3 se**

realiza mediante el goteo del probiótico Vivera®; en P4 se realiza el goteo del simbiótico Munogotas®; y en P5 se realiza el goteo del simbiótico Daily Biotic Flora®.



**Figura 7: Esquema resumen del proceso de desmineralización.**

### 6.9 Análisis de viabilidad y pureza de los cultivos

Para comprobar la viabilidad de las cepas bacterianas en cada pocillo se realizaron controles microbiológicos cada mañana previo al cambio de caldo BHI. Para ello se dividieron 2 placas de agar TYCS por placa de cultivo en 6 partes iguales, dando un total de 12 zonas las cuales fueron rotuladas para corresponder cada una a un pocillo de la placa de cultivo. Este procedimiento se repitió también en 2 placas de agar MRS por cada placa de cultivo de los grupos P3, P4 y P5. En cada zona de las placas de agar se sembró caldo antiguo para luego ser incubadas por 24 horas a 37°C en microaerofilia. Este procedimiento se realizó a partir del segundo día, y también se repitió al finalizar el quinto día.

Para el análisis de pureza de los cultivos se realizaron análisis macromorfológicos y micromorfológicos. El primero se realizó utilizando la lupa

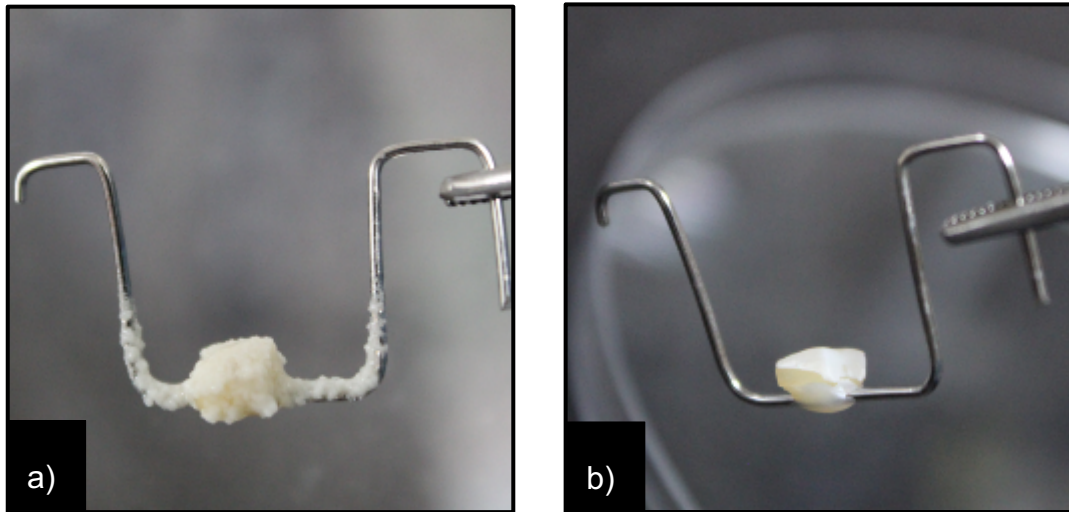
estereoscópica y se analizaron directamente las colonias sembradas en las placas de agar MRS y TYCS. El análisis micromorfológico fue realizado a través de tinciones Gram de frotis obtenidos directamente del caldo antiguo de un pocillo aleatorio para cada placa de cultivo celular. Posteriormente fueron observadas en microscopio óptico Axiostar Plus (ZEISS®, Alemania). También se realizaron tinciones Gram de frotis obtenido de una colonia crecida en los agares TYCS sembrados anteriormente.

#### **6.10 Acidogenicidad de la biopelícula**

Cada mañana se realizó la medición del pH del caldo BHI+G desechado de las placas P1 a P5. Esta medición se realizó utilizando el medidor de pH de sobremesa Orion Star™ A211 (Thermo Scientific™). El caldo fue extraído de las placas para ser depositado en un vaso precipitado distinto para cada una de las placas.

#### **6.11 Remoción de la biopelícula y almacenamiento de las muestras**

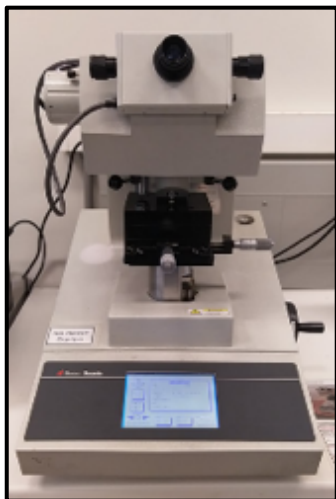
Al finalizar el proceso de desmineralización al quinto día, se realizó la remoción mecánica de la biopelícula utilizando un cepillo de dientes suave, clorhexidina y agua destilada estéril. Una vez limpias las muestras fueron retiradas de su armazón metálico y se almacenaron en tubos centrifuga de 2 mL con agua destilada estéril, rotuladas y almacenadas a 4°C hasta el momento de las mediciones de microdureza superficial (Figura 8).



**Figura 8: Proceso de remoción de la biopelícula y limpieza de las muestras.** a) Muestra de esmalte previa remoción mecánica de la biopelícula. b) Muestra de esmalte posterior a remoción mecánica de la biopelícula. Imágenes obtenidas en coautoría con Valerio, 2023.

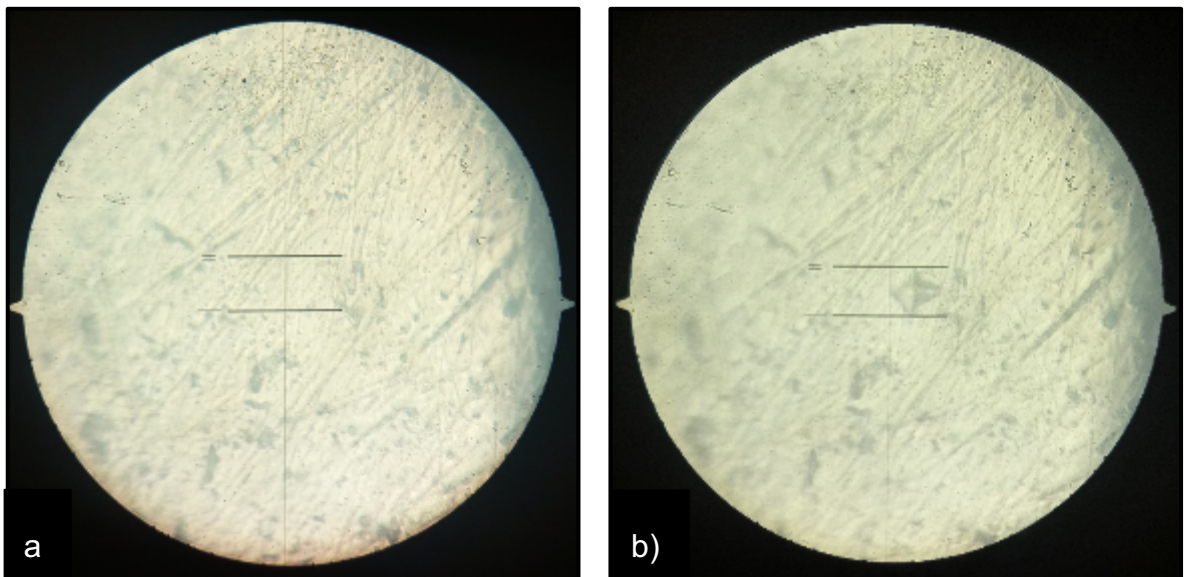
### 6.12 Medición de microdureza superficial de Vickers

Este procedimiento se llevó a cabo utilizando el durómetro Duramin (Struers, EE. UU.) (Figura 9) ubicado en el Laboratorio de Metalografía y Microdureza del Departamento de Ingeniería Química, Biotecnología y Materiales de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile.



**Figura 9: Microindentador Duramin de Struers (EEUU).**

Para el procedimiento, se colocaron las muestras en un trozo de cera por el lado dentinario para estabilizarlas mientras se realiza la medición. En el microdurómetro se realizan 3 indentaciones por bloque de esmalte empleando una carga de 1.96 N durante 15 segundos. Las indentaciones con forma de rombo son analizadas por el microdurómetro donde se determinaron las dimensiones de ambas diagonales, para luego obtener el valor de HV por cada indentación (Figura 10a y 10b). Los valores fueron registrados en una hoja de cálculo de Microsoft® Excel® para luego realizar el cálculo del promedio de los tres valores obtenidos.



**Figura 10: Medición de microdureza en microdurómetro Duramin.** a) Superficie del esmalte en microscopio previo a indentación. b) Superficie del esmalte en microscopio posterior a indentación.

### 6.13 Análisis estadístico de valores de dureza superficial

Utilizando los valores obtenidos y registrados en la hoja de cálculo Microsoft® Excel® se realizó el cálculo del promedio y la desviación estándar de los valores promedio obtenidos para cada grupo de exposición. Para el análisis estadístico, los datos fueron procesados utilizando el programa STATA, donde se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar si los datos presentan una distribución normal. Al observar que los datos presentaban una distribución normal se aplicó una prueba

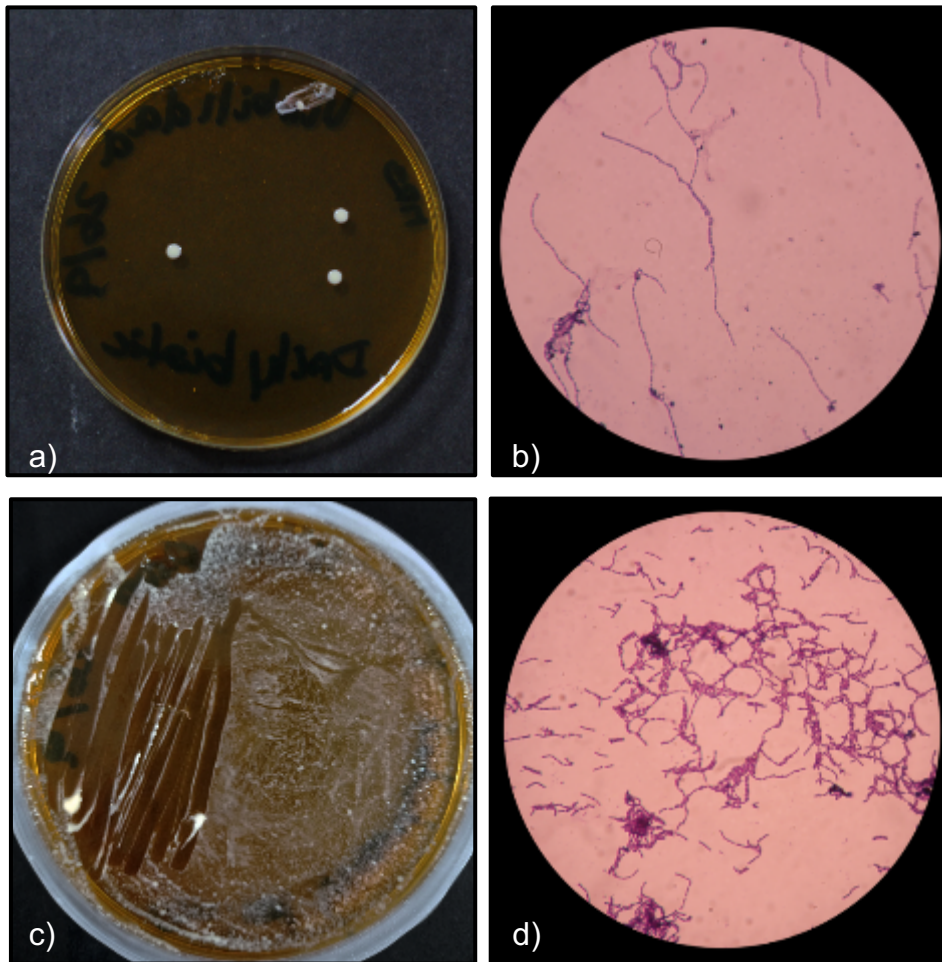
paramétrica para evaluar si los grupos presentan diferencias estadísticamente significativas, para ello se utilizó el test ANOVA. Al observar diferencias estadísticamente significativas se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para comparar las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Para todos los análisis se consideró un 95% de confiabilidad y un  $p < 0,05$  para considerar las diferencias estadísticamente significativas.



## 7. RESULTADOS

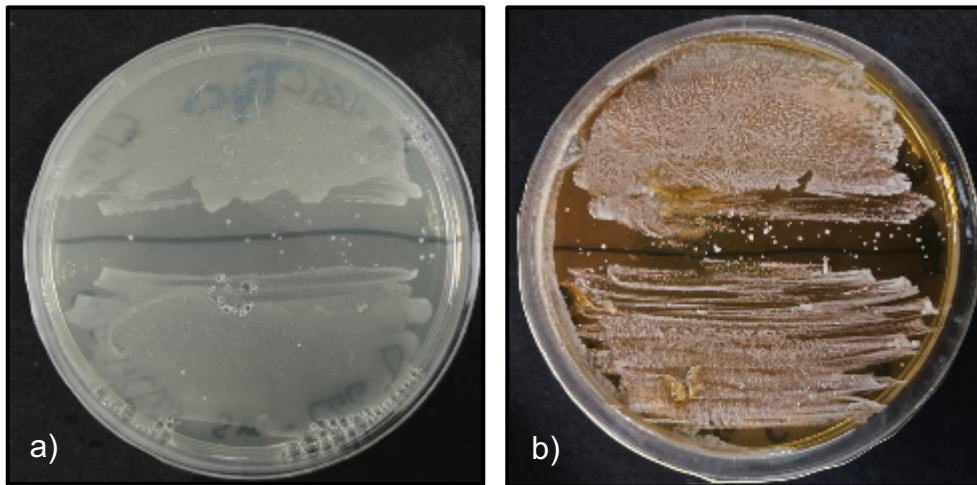
### 7.1 Estudios de viabilidad y co-cultivo

Como resultado de las pruebas de viabilidad de los simbióticos LGGvitD y LGGvitC, se observó crecimiento bacteriano en ambos cultivos. En el caso de LGGvitD se observó una incontable cantidad de colonias cuyo análisis morfológico macro y microscópico fue compatible con la especie del género *Lacticaseibacillus* (Figura 11c). En el caso de LGGvitC se observó un menor número de colonias transcurridas las 24 horas de incubación (Figura 11a). Al realizar el análisis micromorfológico de este simbiótico se observó presencia de células de morfología bacilar de pared Gram positivo agrupadas en cadenas largas compatible con la descripción micromorfológica de *Lacticaseibacillus rhamnosus* (Figura 11b). Esta morfología es similar a la observada en LGGvitD, con excepción de la extensión de la cadena de células más corta en longitud (Figura 11d).

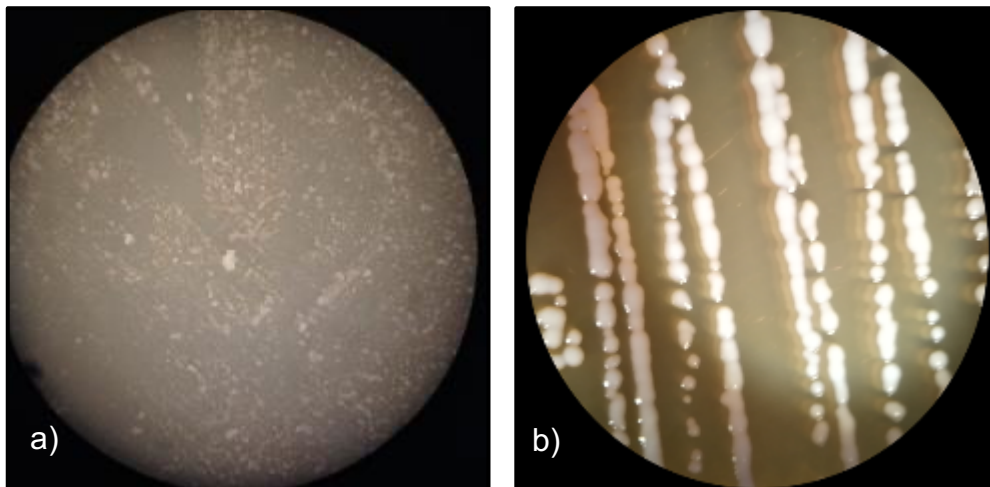


**Figura 11: Viabilidad de LGGvitC y LGGvitD.** a) Placa de cultivo de control de viabilidad LGGvitC en agar MRS b) Análisis micromorfológico de LGGvitC. c) Placa de cultivo de control de viabilidad LGGvitD en agar MRS. d) Análisis micromorfológico de LGGvitD.

En los estudios de co-cultivo, se observó crecimiento de la especie *S. mutans* cepa ATCC 25175 y LGGvitC; y *S. mutans* ATCC 25175 y LGGvitD luego de su incubación simultánea en BHI y posterior siembra en los medios selectivos TYCS y MRS (Figura 12a y 12b). Ver el análisis morfológico macro y microscópico (Figura 13a y 13b).



**Figura 12: Placas de co-cultivo.** a) Co-cultivo LGGvit C y *S. mutans* (mitad superior de la placa) y LGGvitD y *S. mutans* (mitad inferior de la placa) en agar TYCS. b) Co-cultivo LGGvitC y *S. mutans* (mitad superior de la placa) y LGGvitD y *S. mutans* (mitad inferior de la placa) en agar MRS.



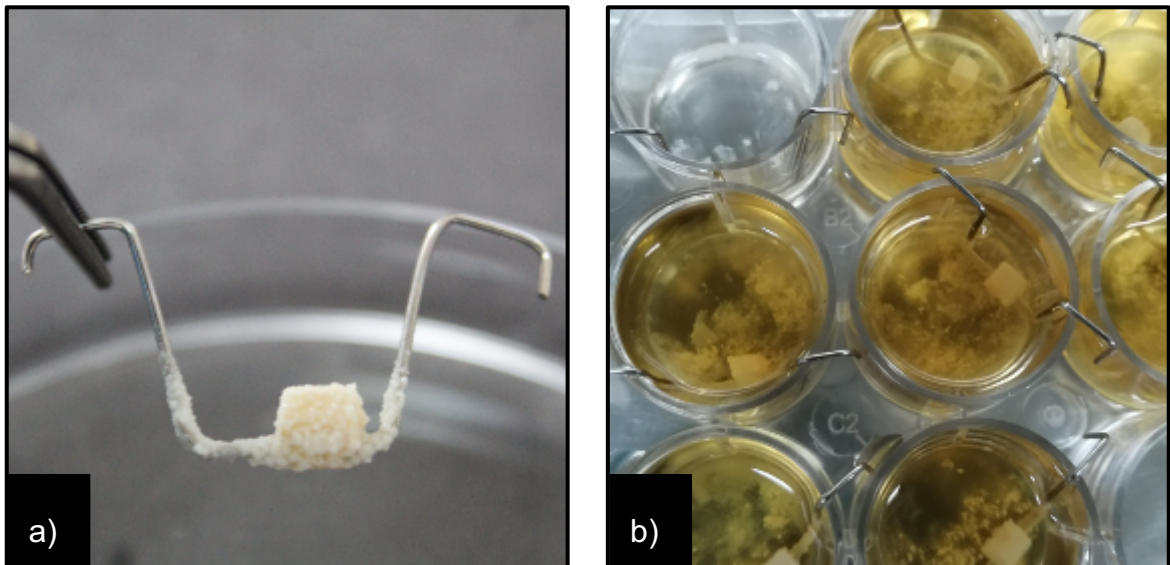
**Figura 13: Colonias de estudios de co-cultivo en lupa estereoscópica.** a) Colonias de *S. mutans* en agar TYCS. b) Colonias de LGG en agar MRS.

## 7.2 Formación de biopelícula en el esmalte y crecimiento bacteriano

La formación de biopelícula pudo observarse luego de transcurridas las 36 horas de inoculación de *S. mutans* en las placas de cultivo, se presentó como placa blanquecina de aspecto rugoso en la superficie del diente y se extendió al alambre

inmerso en el caldo BHI que lo sostenía en la placa de cultivo (Figura 14a). A lo largo del proceso se pudo observar el crecimiento de esta placa blanquecina.

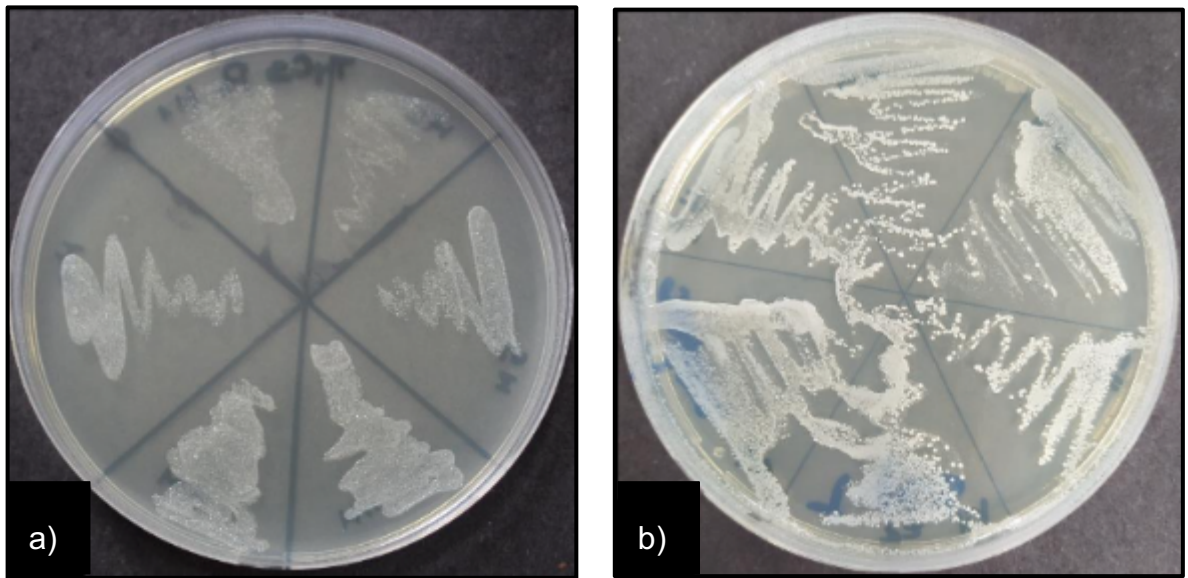
Durante el proceso de exposición se pudo evidenciar un aumento de la turbidez de los caldos, con depósitos en el fondo que coinciden con el comportamiento de los crecimientos bacterianos de *S. mutans* en caldo; y con suspensión de colonias, coincidentes con el comportamiento de LGG en caldo. Esto indica un crecimiento bacteriano en el medio que forma parte de la biopelícula de esmalte (Figura 14b).



**Figura 14: Crecimiento bacteriano.** a) Biopelícula en diente montado y alambre. b) Colonias en fondo de placas de cultivo.

### 7.3 Análisis de viabilidad y pureza de los cultivos

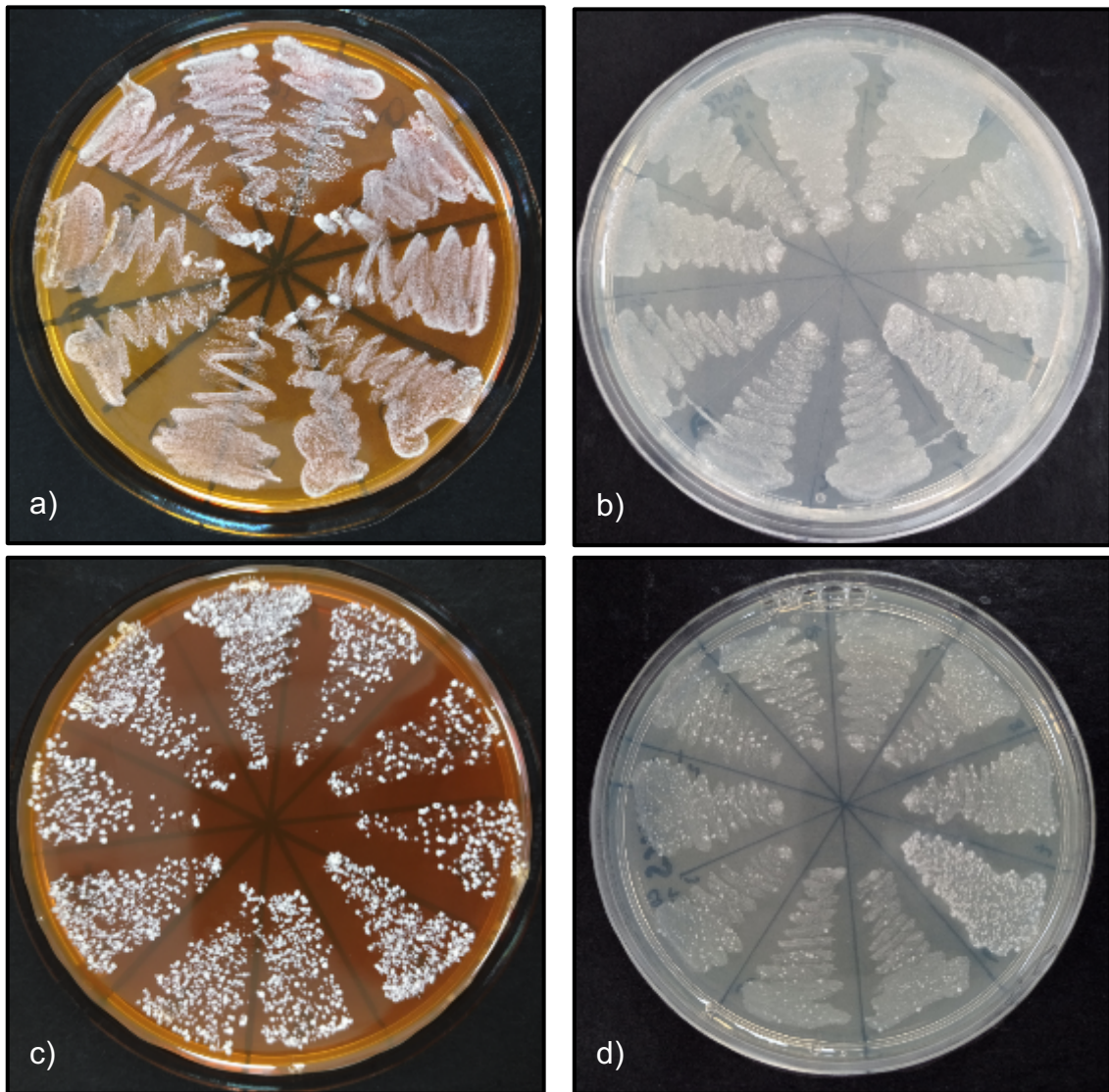
Respecto al análisis de viabilidad y pureza de los cultivos de *S. mutans* luego de su inoculación e incubación durante 36 horas, se observó un leve crecimiento bacteriano (Figura 15a). Sin embargo, al comenzar las exposiciones a sacarosa 10% se pudo evidenciar mayor crecimiento en los agares de control (Figura 15b). En ellos solo se observó crecimiento de *S. mutans*, lo cual fue corroborado a través del análisis morfológico macro y microscópico.



**Figura 15: Placas de control de viabilidad de *S. mutans*.** a) Control a las 36 horas post inoculación. b) Control a los 5 días en grupo control positivo.

A partir del segundo día de exposición se analizó también la viabilidad de los caldos para ambas especies bacterianas con cultivos en medios selectivos respectivos para cada especie, MRS y TYCS. En ellos se observó un amplio crecimiento bacteriano con presencia de colonias morfológicamente compatibles con LGG y *S. mutans* en sus medios correspondientes. El proceso se realizó todos los días a partir del segundo día y no se observó contaminación con otras especies bacterianas o fúngicas (Figura 16a, 16b, 16c y 16d).





**Figura 16: Placas de control de pureza de cultivos de LGGvitC y LGGvitD.** a) Placa de cultivo LGGvitD en agar MRS. b) Placa de cultivo LGGvitD en agar TYCS. c) Placa de cultivo LGGvitC en agar MRS. d) Placa de cultivo LGGvitC en agar TYCS.

En el análisis microscópico de los frotis de los caldos de P1 y P2 se evidenciaron cocáceas Gram positivo agrupadas en cadenas o pares, compatibles con *S. mutans*; mientras que en los frotis de los caldos de P3, P4 y P5 se evidenciaron largas cadenas de bacilos Gram positivo, compatibles con LGG, y cocáceas Gram positivo descritas anteriormente.

#### 7.4 Mediciones de pH

El pH obtenido de los distintos grupos fue anotado por día y además se obtuvo un promedio de las mediciones por muestra. Para P1 (control negativo) el promedio fue de 5,2. Para P2 (control positivo) y para P3 (control probiótico) el promedio fue de 4,76. Para P4 (LGGvitD) fue de 4,86. Para P5 (LGGvitC) fue de 4,88. Los valores en detalle se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1: Valores de pH promedio diarios por grupo.**

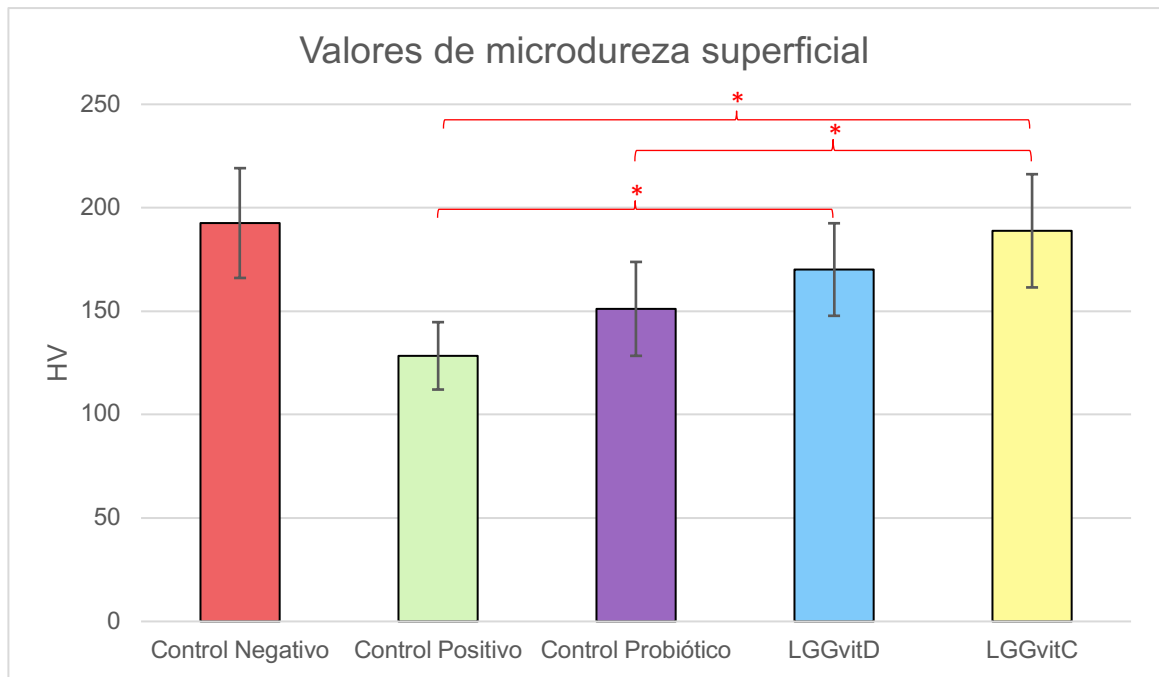
	pH día 1	pH día 2	pH día 3	pH día 4	pH día 5	Promedio pH ± DS
<b>P1</b>	4,2	5,2	5,2	5,4	6,0	5,2 ± 0,64
<b>P2</b>	4,3	5,0	4,9	4,7	4,9	4,76 ± 0,28
<b>P3</b>	4,2	5,0	4,9	4,8	4,9	4,76 ± 0,32
<b>P4</b>	4,2	5,05	5,0	5,07	5,1	4,86 ± 0,37
<b>P5</b>	4,2	5,02	5,0	5,08	5,1	4,88 ± 0,38

### 7.5 Resultados de microdureza superficial de Vickers

Para el ensayo de microdureza superficial de Vickers se obtuvieron 3 valores por muestra y se calculó el promedio para cada una. Posteriormente, se calculó el promedio por grupo obteniendo un valor de 192,6 HV para el grupo control negativo; 128,4 HV para el grupo control positivo; 151,11 HV para el grupo control probiótico; 170,13 HV para el grupo experimental LGGvitD; y 188,95 HV para el grupo experimental LGGvitC.

Al utilizar la prueba de Shapiro-Wilk en el software STATA se determinó que la muestra presentó una distribución normal. Posteriormente se realizó el análisis de varianza ANOVA y se demostró que entre los grupos si se presentaba una diferencia estadísticamente significativa. Finalmente se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni y se obtuvo que al comparar el grupo experimental LGGvitD se observó que presentaba diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) con el grupo control positivo, mas no presentaba diferencias estadísticamente significativas con el grupo control probiótico. Respecto al grupo experimental LGGvitC se obtuvo que existían diferencias estadísticamente significativas con el grupo control positivo y el grupo control probiótico. Los grupos experimentales no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre si (Figura 17).





\* : Diferencias estadísticamente significativas

**Figura 17: Gráfico de valores de microdureza superficial de Vickers para todos los grupos.** Se observan los grupos con diferencias estadísticamente significativas.

## 8. DISCUSIÓN

Este estudio buscó probar la capacidad preventiva de dos simbióticos basados en el probiótico *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG sobre la formación de lesiones de caries. Para ello se utilizó un modelo de caries *in vitro* monoespecie de *S. mutans* sobre bloques de esmalte humano en los cuales se generó un ambiente desmineralizador a través de la exposición a sacarosa de forma regular.

Se decidió utilizar simbióticos comerciales que tuvieran como elemento probiótico a *L. rhamnosus* GG para poder comparar los resultados con el estudio realizado por Valerio en 2023 (Valerio, 2023) donde se validó la capacidad preventiva de este probiótico en el modelo de desmineralización de Ccahuana-Vasquez, y así evaluar la capacidad preventiva en la formación de lesiones de caries al administrarse en conjunto con un prebiótico en base a vitaminas.

Estos simbióticos presentan la misma cantidad de UFC que el probiótico comercial Vivera®. Respecto a los prebióticos presentes en Munogotas® (LGGvitD) solo presenta en sus ingredientes *L. rhamnosus* GG y Vitamina D, sin embargo, se encuentra en un medio distinto, ya que su presentación comercial es en gotas y no liofilizado. Por su parte, Daily Biotic Flora® (LGGvitC) presenta en sus ingredientes maltodextrina, estabilizante que también presenta Vivera®, ácido ascórbico y dióxido de silicio como agente antiaglomerante.

En las pruebas de viabilidad, ambos simbióticos demostraron su capacidad de formar colonias en condiciones de microaerofilia, sin embargo, se observó una gran diferencia en la cantidad de colonias formadas por LGGvitC, ya que presentó una menor cantidad de colonias y de mayor tamaño, pero al análisis micromorfológico se observaron cadenas de *L. rhamnosus* GG de mayor largo respecto a LGG y a LGGvitD. Esto podría explicarse por la capacidad de LGG de catabolizar a L-ascorbato y utilizarlo como fuente de energía, favoreciendo la formación de cadenas por sobre la formación de colonias (Linares y cols., 2011). Respecto a las pruebas de co-cultivo ambos simbióticos demostraron ser capaces de coexistir con *S. mutans*.

Para evaluar la desmineralización de los tejidos dentarios, en este estudio se utilizó la microdureza superficial de Vickers ya que está demostrada su correlación con la cantidad mineral de los tejidos dentarios (Davidson y cols., 2009). Se pudo comprobar de forma visual que las muestras de los grupos control positivo, control probiótico y grupos experimentales formaron lesiones de caries mostrando una clara zona de desmineralización compatibles con el código 2 descrito en el *International Caries Detection and Assessment System* (ICDAS) al presentar una superficie blanquecina, opaca y porosa. (Gugnani y cols., 2011)

Según los resultados obtenidos en la microdureza superficial de Vickers se pudo determinar que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales simbióticos y el grupo control positivo, lo cual indicaría que tanto LGGvitD como LGGvitC tienen una acción preventiva en la formación de lesiones de caries. Además, se observa que en comparación con el grupo control

probiótico el simbiótico LGGvitC también presenta diferencias estadísticamente significativas, lo cual indicaría que, en presencia de vitamina C el probiótico LGG potencia su efecto protector ante la formación de lesiones de caries producidas por *S. mutans*.

A la fecha no existen estudios que hablen de la relación entre vitamina C, LGG y la formación de caries. Sin embargo, en 1994 Väänänen y cols evaluaron los niveles plasmáticos de vitamina C respecto al riesgo de caries, donde observaron una disminución del riesgo en pacientes que tenían altos niveles séricos de ácido ascórbico y plantearon que esto se debía a la capacidad bacteriostática y bactericida de la vitamina en estudios *in vitro* (Väänänen y cols., 1994). En 2019, Syed y cols. analizaron la relación entre el riesgo de caries y los niveles salivales de vitamina C, y concluyeron que existían diferencias estadísticamente significativas (Syed y cols., 2019). Ambos estudios evaluaron los efectos de los niveles séricos o salivales de la vitamina C sobre el riesgo de caries, pero no sobre su efecto tópico. Respecto a su acción a nivel local, en el 2020 Eydou y cols. evaluaron el efecto que tenía la vitamina C sobre el crecimiento y el potencial de formar biopelícula de *S. mutans*. En su estudio se pudo demostrar la capacidad inhibitoria que tiene la vitamina C sobre *S. mutans*, donde ejercía su acción inmediatamente posterior a la aplicación del prebiótico (Eydou y cols., 2020). Esta evidencia, en conjunto con la capacidad de LGG de metabolizar al ácido ascórbico, podría explicar los resultados obtenidos en este estudio. Sin embargo, según el estudio realizado por Wu y cols. en 2016, *S. mutans* también sería capaz de metabolizar la vitamina C y utilizarlo como fuente de energía; sus resultados mostraron que efectivamente *S. mutans* era capaz de utilizarla, pero que esto dependía de la concentración de la vitamina, demostrando que a altas concentraciones la vitamina presentaba un efecto bacteriostático (Wu y cols., 2016).

Esta evidencia, en conjunto con los resultados obtenidos en este estudio podrían sugerir la capacidad de LGG y vitamina C de actuar como un simbiótico sinérgico y complementario, actuando ambos de forma particular para lograr una disminución en la acción de *S. mutans*, y utilizando la vitamina C como sustrato para

favorecer el crecimiento de LGG. Se deben realizar más estudios para determinar el mecanismo de acción predominante en este proceso.

Respecto a la vitamina D, existe múltiple y variada literatura sobre su relación con el riesgo de caries, pero a la fecha no existe literatura que relacione a la vitamina D con LGG y la formación de lesiones de caries. La gran mayoría de los estudios que evalúan la relación entre vitamina D y caries dental se basan en los niveles séricos de la vitamina respecto al riesgo de caries en distintas poblaciones y edades. En 2024 Ji y cols. realizaron una revisión sistemática, donde se concluye que los niveles séricos de vitamina D en niños con caries temprana de la infancia son subóptimos en comparación con niños libres de caries, y que en niños con caries temprana de la infancia severa estos niveles son aún más bajos (Ji y cols., 2024). También en 2024, Asante y cols. evaluaron una población adulta donde se observa que los niveles de vitamina D tienen una relación inversa y dosis dependiente respecto a la cantidad de lesiones de caries (Asante y cols., 2024). Se ha descrito anteriormente que el mecanismo de acción de vitamina D probablemente sea a través de la modulación de la respuesta inmune, y en 2024, Fefelova y cols. demostraron que la deficiencia de vitamina D genera una disminución de la respuesta inmune en mucosa oral lo cual aumentaría el riesgo de caries (Fefelova y cols., 2024).

En cuanto a la evaluación de vitamina D a nivel salival y el riesgo de caries, en 2024 Nireeksha y cols. evaluaron los niveles salivales de vitamina D, interleucina 6 y 17A y del péptido antimicrobiano LL-37 respecto a lesiones de caries con diversa severidad, y concluyeron que solo existía diferencia estadísticamente significativa respecto a los niveles de vitamina D de forma inversamente proporcional (Nireeksha y cols., 2024). Sin embargo, en 2021 Hussein y cols. evaluaron los niveles séricos y salivales de vitamina D y su relación con el riesgo de caries donde obtuvieron que no existe una asociación estadísticamente significativa (Hussein y cols., 2021).

A la fecha no existen estudios que midan el efecto preventivo de la vitamina D de forma tópica en la formación de lesiones de caries. Respecto a su relación con LGG la literatura refiere que ambos tienen una acción sinérgica cuando se trata de

la absorción de la vitamina a nivel intestinal y la mejora de la respuesta inmune, pero no hay evidencia de que ambos se potencien de forma local.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, el simbiótico LGGvitD presenta una diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control positivo, estableciendo que tiene una acción preventiva frente al proceso de desmineralización, pero no presenta diferencias estadísticamente significativas con el grupo control probiótico, por lo que no es posible determinar que los resultados obtenidos se deban a una acción sinérgica entre el probiótico y el prebiótico. De acuerdo a la evidencia reportada, es necesario un estudio que evalúe la acción del simbiótico considerando el efecto a nivel de la respuesta inmune para descartar o corroborar si tiene o no un efecto sobre la prevención de las lesiones de caries.

Respecto a los valores de pH obtenidos, se observó el descenso inicial del pH en todas las placas, esto debido a que la sacarosa es utilizada en el proceso de formación de biopelícula y metabolización de *S. mutans*. En los días posteriores estos valores se fueron acercando al neutro en todas las placas, pero específicamente con una baja de la acidez más notoria en la placa de control negativo. Los valores de pH de la placa de control positivo y placa control probiótico presentaban valores similares entre sí, esto puede explicarse debido a la naturaleza acidófila y acidogénica de LGG (Schwendicke y cols., 2014), sin embargo, la evidencia no es concluyente al respecto de la capacidad de LGG de metabolizar sacarosa, por lo que sus propiedades acidogénicas se deben principalmente a su naturaleza como microorganismo fermentador y su capacidad de generar ácido láctico (Segers y Lebeer, 2014; Capurso, 2019). Las placas experimentales de LGGvitC y LGGvitD presentan valores similares que presentan un leve aumento al final de la exposición. Si bien ambos utilizan el mismo probiótico, por lo que presentan las mismas propiedades acidogénicas, se esperaba observar una mayor acidez en LGGvitC puesto que la vitamina C por sí sola presenta valores de pH entre 2 y 3, lo cual no ocurrió. Esto podría deberse a la posible metabolización del ácido ascórbico por parte de LGG.

A pesar de todo lo anterior, existen aspectos a mejorar en este estudio. Si bien los simbióticos probados fueron elegidos por ser productos comerciales, es recomendable realizar una línea de investigación futura donde se analicen todos los componentes por separado para así evitar variables confundentes, como excipientes o presentaciones diferentes entre los productos, y estandarizar así las concentraciones de las vitaminas.

Además, es importante reevaluar la forma de aplicación durante las exposiciones, puesto que si bien la instilación de los simbióticos y probióticos demostró ser capaz de permitir una exposición viable de las muestras a LGG esta forma dista mucho de la realidad de consumo. Las indicaciones de los fabricantes refieren que se debe diluir el producto liofilizado para luego ingerirlo, permitiendo un paso más transitorio del líquido sobre las superficies dentarias y no de forma localizada como se realizó en esta investigación. Para futuros estudios *in vitro* se deben evaluar otras vías de exposición tales como la inmersión de los bloques de esmalte en el probiótico/simbiótico.

Al ser este un estudio *in vitro* con un modelo de caries monoespecie se limita la diversidad de la biopelícula formada. En la cavidad oral encontramos biopelículas con una gran diversidad y complejidad, por lo tanto, es importante evaluar en un futuro la posibilidad de ampliar esta biopelícula.

Los alentadores resultados obtenidos en esta investigación abren las puertas a nuevas líneas de investigación con el objetivo de plantear un posible nuevo tratamiento preventivo de las lesiones de caries basado en la mantención y recuperación del equilibrio microbiológico del ecosistema oral a través de un producto comercial ya validado por la industria farmacéutica.

## 9. CONCLUSIONES

Los bloques de esmalte humano tratados con los simbióticos LGGvitC y LGGvitD presentan mayores valores de microdureza que aquellos que expuestos al proceso de desmineralización propuesto en el modelo *in vitro* de Ccahuana-Vasquez, por lo que presentan una acción preventiva sobre las lesiones incipientes de caries.

El simbiótico LGGvitC presenta valores de microdureza mayores que los logrados con el grupo control probiótico tratados solamente con LGG, por lo que se puede determinar que LGG y vitamina C actúan de forma conjunta sobre la biopelícula de *S. mutans*.

Si bien LGGvitD presenta una microdureza superficial mayor que el grupo control positivo, no se puede concluir que su respuesta se deba a una acción local ya que no presenta diferencias significativas con el grupo control probiótico. Es necesario un estudio de sus efectos a nivel sistémico para corroborar o descartar esta relación.

Los resultados obtenidos en esta investigación abren nuevas líneas de investigación sobre el posible efecto preventivo que puedan tener estos simbióticos sobre la enfermedad de caries.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asante, E. O., Chen, Y., Eldholm, R. S., Høvik, H., Kolberg, M., y cols. (2024). Associations of Serum Vitamin D With Dental Caries and Periodontitis: The HUNT Study. *International Dental Journal*, 74(3), 500-509. <https://doi.org/10.1016/j.identj.2024.03.005>
- Askeland, D. R., y Wright, W. J. (2016). *Ciencia e ingeniería de materiales 7a edición* (Dureza de los materiales. pp 202-203; 7ª edición). Cengage Learning.
- Bijle, M. N., Ekambaram, M., Lo, E. C. M., y Yiu, C. K. Y. (2021). Combined effect of arginine and fluoride on the growth of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Scientific Reports*, 11(1), 973. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79684-2>
- Botelho, J., Machado, V., Proença, L., Delgado, A. S., y Mendes, J. J. (2020). Vitamin D Deficiency and Oral Health: A Comprehensive Review. *Nutrients*, 12(5), 1471. <https://doi.org/10.3390/nu12051471>
- Cagetti, M., Mastroberardino, S., Milia, E., Cocco, F., Lingström, P., y cols. (2013). The Use of Probiotic Strains in Caries Prevention: A Systematic Review. *Nutrients*, 5(7), 2530-2550. <https://doi.org/10.3390/nu5072530>
- Callister, W. D., y Rethwisch, W. G. (2018). *Materials science and engineering, an introduction* (Hardness. pp 165-171; 10ª edición). John Wiley & Sons, Inc.
- Capurso, L. (2019). Thirty Years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: A Review. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 53 Suppl 1, S1-S41. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001170>
- Ccahuana-Vásquez, R. A., y Cury, J. A. (2010). *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Brazilian Oral Research*, 24(2), 135-141. <https://doi.org/10.1590/S1806-83242010000200002>
- Chen, D., Tang, H., Li, Y., Yang, H., Wang, H., y cols. (2023). Vitamin D3 and *Lactobacillus rhamnosus* GG/p40 Synergize to Protect Mice From Colitis by



Promoting Vitamin D Receptor Expression and Epithelial Proliferation. *Inflammatory Bowel Diseases*, 29(4), 620-632. <https://doi.org/10.1093/ibd/izac238>

Cheng, J., Zhai, J., Zhong, W., Zhao, J., Zhou, L., y cols. (2022). Lactobacillus rhamnosus GG Promotes Intestinal Vitamin D Absorption by Upregulating Vitamin D Transporters in Senile Osteoporosis. *Calcified Tissue International*, 111(2), 162-170. <https://doi.org/10.1007/s00223-022-00975-z>

Collys, K., Slop, D., Cleymaet, R., Coomans, D., y Michotte, Y. (1992). Load dependency and reliability of microhardness measurements on acid-etched enamel surfaces. *Dental Materials*, 8(5), 332-335. [https://doi.org/10.1016/0109-5641\(92\)90110-X](https://doi.org/10.1016/0109-5641(92)90110-X)

Coqueiro, A. Y., Bonvini, A., Raizel, R., Tirapegui, J., y Rogero, M. M. (2018). Probiotic supplementation in dental caries: is it possible to replace conventional treatment? *Nutrire*, 43(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s41110-018-0064-3>

Davidson, C. L., Hoekstra, I. S., y Arends, J. (2009). Microhardness of Sound, Decalcified and Etched Tooth Enamel Related to the Calcium Content. *Caries Research*, 8(2), 135-144. <https://doi.org/10.1159/000260101>

Devine, D. A., y Marsh, P. D. (2009). Prospects for the development of probiotics and prebiotics for oral applications. *Journal of Oral Microbiology*, 1(1), 1949. <https://doi.org/10.3402/jom.v1i0.1949>

Doseděl, M., Jirkovský, E., Macáková, K., Krčmová, L. K., Javorská, L., y cols. (2021). Vitamin C-Sources, Physiological Role, Kinetics, Deficiency, Use, Toxicity, and Determination. *Nutrients*, 13(2), 615. <https://doi.org/10.3390/nu13020615>

Eydou, Z., Jad, B. N., Elsayed, Z., Ismail, A., Magaogao, M., y cols. (2020). Investigation on the effect of vitamin C on growth & biofilm-forming potential

of *Streptococcus mutans* isolated from patients with dental caries. *BMC Microbiology*, 20, 231. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01914-4>

Fan W. (2023). *Obtención y caracterización de bacteriocinas aisladas de Lacticaseibacillus rhamnosus GG y efecto sobre el patobionte cariogénico Streptococcus mutans ATCC 25175*. Universidad de Chile - Facultad de Odontología.

Fefelova, E. V., Maksimenya, M. V., Putneva, A. S., Ushnitsky, I. D., Mishchenko, M. N., y cols. (2024). [The effect of vitamin D deficiency on the content of some soluble signaling molecules in the oral fluid in individuals with dental caries]. *Stomatologija*, 103(2), 12-17. <https://doi.org/10.17116/stomat202410302112>

Feng, J., Liu, J., Jiang, M., Chen, Q., Zhang, Y., y cols. (2023). The Role of Oral Nitrate-Reducing Bacteria in the Prevention of Caries: A Review Related to Caries and Nitrate Metabolism. *Caries Research*, 57(2), 119-132. <https://doi.org/10.1159/000529162>

Food, Nations, A. O. of the U., y Organization, W. H. (2006). *Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Frencken, J. E. (2017). Atraumatic restorative treatment and minimal intervention dentistry. *British Dental Journal*, 223(3), 183-189. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2017.664>

Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., y cols. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(8), 491-502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>

- Gibson, Scott, K., Rastall, R., Tuohy, K., Hotchkiss, A., y cols. (2010). Dietary prebiotics: Current status and new definition. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 7, 1-19. <https://doi.org/10.1616/1476-2137.15880>
- Glenn, F. B., y Glenn, W. D. (1994). Use of chemotherapeutic agents for caries prevention. *Journal of Dental Research*, 73(7), 1236-1236. <https://doi.org/10.1177/00220345940730070201>
- Gugnani, N., Pandit, I., Srivastava, N., Gupta, M., y Sharma, M. (2011). International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): A New Concept. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 4(2), 93-100. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-1089>
- Hasslöf, P., y Stecksén-Blicks, C. (2020). Chapter 10: Probiotic Bacteria and Dental Caries. *Monographs in Oral Science*, 28, 99-107. <https://doi.org/10.1159/000455377>
- Haukioja, A. (2010). Probiotics and Oral Health. *European Journal of Dentistry*, 4(3), 348-355.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., y cols. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506-514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hu, Z., Zhou, F., y Xu, H. (2022). Circulating vitamin C and D concentrations and risk of dental caries and periodontitis: A Mendelian randomization study. *Journal of Clinical Periodontology*, 49(4), 335-344. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13598>
- Hujoel, P. P. (2013). Vitamin D and dental caries in controlled clinical trials: systematic review and meta-analysis. *Nutrition Reviews*, 71(2), 88-97. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00544.x>

- Hussein, A. S., Almoudi, M. M., Abu-Hassan, M. I., Schroth, R. J., Saripudin, B., y cols. (2021). Serum and Saliva 25(OH)D Levels in Relation to Dental Caries in Young Children. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 45(6), 414-420. <https://doi.org/10.17796/1053-4625-45.6.8>
- Inchingolo, A. D., Malcangi, G., Semjonova, A., Inchingolo, A. M., Patano, A., y cols. (2022). Oralbiotica/Oralbiotics: The Impact of Oral Microbiota on Dental Health and Demineralization: A Systematic Review of the Literature. *Children (Basel, Switzerland)*, 9(7), 1014. <https://doi.org/10.3390/children9071014>
- James, S. L., Abate, D., Abate, K. H., Abay, S. M., Abbafati, C., y cols. (2018). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 392(10159), 1789-1858. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32279-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32279-7)
- Ji, S., Zhao, K., Ma, L., Chen, X., Zheng, D., y cols. (2024). The Association Between Vitamin D and Early Childhood Caries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 22, 63-72. <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.b4928565>
- Kanasi, E., Dewhirst, F. E., Chalmers, N. I., Kent, R., Moore, A., y cols. (2010). Clonal Analysis of the Microbiota of Severe Early Childhood Caries. *Caries Research*, 44(5), 485-497. <https://doi.org/10.1159/000320158>
- Kilian, M., Chapple, I. L. C., Hannig, M., Marsh, P. D., Meuric, V., y cols. (2016). The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. *British Dental Journal*, 221(10), 657-666. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2016.865>
- Kumar, P. S., y Mason, M. R. (2015). Mouthguards: does the indigenous microbiome play a role in maintaining oral health? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00035>

- Laleman, I., Detailleur, V., Slot, D. E., Slomka, V., Quirynen, M., y cols. (2014). Probiotics reduce mutans streptococci counts in humans: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Investigations*, 18(6), 1539-1552. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1228-z>
- Li, C., Niu, Z., Zou, M., Liu, S., Wang, M., y cols. (2020). Probiotics, prebiotics, and synbiotics regulate the intestinal microbiota differentially and restore the relative abundance of specific gut microorganisms. *Journal of Dairy Science*, 103(7), 5816-5829. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-18003>
- Li, Meng, L., Shen, L., y Ji, H.-F. (2023). Regulation of gut microbiota by vitamin C, vitamin E and  $\beta$ -carotene. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 169, 112749. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112749>
- Li, Zafar, S., Salih Ibrahim, R. M., Chi, H.-L., Xiao, T., y cols. (2021). Exercise and food supplement of vitamin C ameliorate hypertension through improvement of gut microflora in the spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*, 269, 119097. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119097>
- Linares, D., Michaud, P., Delort, A.-M., Traïkia, M., y Warrand, J. (2011). Catabolism of l-Ascorbate by *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 4140-4147. <https://doi.org/10.1021/jf104343r>
- Markowiak, P., y Śliżewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, 9(9), 1021. <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Marsh, P. D. (2018). In Sickness and in Health—What Does the Oral Microbiome Mean to Us? An Ecological Perspective. *Advances in Dental Research*, 29(1), 60-65. <https://doi.org/10.1177/0022034517735295>
- Marsh, P. D., Head, D. A., y Devine, D. A. (2015). Ecological Approaches to Oral Biofilms: Control without Killing. *Caries Research*, 49(Suppl. 1), 46-54. <https://doi.org/10.1159/000377732>

- Mayumi, S., Kuboniwa, M., Sakanaka, A., Hashino, E., Ishikawa, A., y cols. (2021). Potential of Prebiotic D-Tagatose for Prevention of Oral Disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.767944>
- Ministerio de Salud. (2019). *Informe Encuesta Nacional de Salud 2016-2017: Salud Bucal*. Ministerio de Salud.
- Näse, L., Hatakka, K., Savilahti, E., Saxelin, M., Pönkä, A., y cols. (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. <https://doi.org/10.1159/000047484>
- Naveillán. (2020). *Efecto del probiótico Lactobacillus rhamnosus SP1 de manera tópica, en la progresión de lesiones de caries de esmalte, en un modelo in situ*. Universidad de Chile - Facultad de Odontología.
- Nireeksha, Hegde, M. N., y Kumari N, S. (2024). Potential role of salivary vitamin D antimicrobial peptide LL-37 and interleukins in severity of dental caries: an ex vivo study. *BMC Oral Health*, 24(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s12903-023-03749-7>
- Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., y cols. (2003). Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(1), 18-35. <https://doi.org/10.1080/07315724.2003.10719272>
- Padayatty, S. J., y Levine, M. (2016). Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. *Oral Diseases*, 22(6), 463-493. <https://doi.org/10.1111/odi.12446>
- Padilla. (2018). *Efecto remineralizante de distintas concentraciones de un agente a base de fluor y grafeno en bloques de esmalte desmineralizado*. Universidad de Chile - Facultad de Odontología.

- Philip, N., Suneja, B., y Walsh, L. J. (2018). Ecological Approaches to Dental Caries Prevention: Paradigm Shift or Shibboleth? *Caries Research*, 52(1-2), 153-165. <https://doi.org/10.1159/000484985>
- Pitts, N. B., Twetman, S., Fisher, J., y Marsh, P. D. (2021). Understanding dental caries as a non-communicable disease. *British Dental Journal*, 231(12), 749-753. <https://doi.org/10.1038/s41415-021-3775-4>
- Pørksen, C. J., Keller, M. K., Damholt, A., Frederiksen, A. K. S., Ekstrand, K. R., y cols. (2023). The effect of a lozenge combining prebiotic arginine and probiotics on caries increment in children during 10-12 months, a randomized clinical trial. *Journal of Dentistry*, 135, 104599. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2023.104599>
- Rigo, L., Bidinotto, A. B., Hugo, F. N., Neves, M., y Hilgert, J. B. (2023). Untreated caries and serum vitamin D levels in children and youth of the United States: NHANES 2013-2014. *Brazilian Dental Journal*, 34(1), 99-106. <https://doi.org/10.1590/0103-6440202305123>
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., y cols. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, 104(S2), S1-S63. <https://doi.org/10.1017/S0007114510003363>
- Rodríguez, G., Ruiz, B., Faleiros, S., Vistoso, A., Marró, M. L., y cols. (2016). Probiotic Compared with Standard Milk for High-caries Children. *Journal of Dental Research*, 95(4), 402-407. <https://doi.org/10.1177/0022034515623935>
- Saha, S., Tomaro-Duchesneau, C., Tabrizian, M., y Prakash, S. (2012). Probiotics as oral health biotherapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12(9), 1207-1220. <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.693474>
- Sánchez, M. T., Ruiz, M. A., y Morales, M. E. (2015). Microorganismos probióticos y salud. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 56(1), 45-59. <https://doi.org/10.4321/S2340-98942015000100007>

- Sanders, M. E. (2008). Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. *Clinical Infectious Diseases*, 46(s2), S58-S61. <https://doi.org/10.1086/523341>
- Schwendicke, F. (2019). Less Is More? The Long-Term Health and Cost Consequences Resulting from Minimal Invasive Caries Management. *Dental Clinics of North America*, 63(4), 737-749. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2019.06.006>
- Schwendicke, F., Dörfer, C., Kneist, S., Meyer-Lueckel, H., y Paris, S. (2014). Cariogenic Effects of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in a Dental Biofilm Model. *Caries Research*, 48(3), 186-192. <https://doi.org/10.1159/000355907>
- Segers, M. E., y Lebeer, S. (2014). Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG--host interactions. *Microbial Cell Factories*, 13 Suppl 1(Suppl 1), S7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S7>
- Selwitz, R. H., Ismail, A. I., y Pitts, N. B. (2007). Dental caries. *Lancet (London, England)*, 369(9555), 51-59. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60031-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60031-2)
- Shang, M., y Sun, J. (2017). Vitamin D/VDR, probiotics, and gastrointestinal diseases. *Current medicinal chemistry*, 24(9), 876-887. <https://doi.org/10.2174/0929867323666161202150008>
- Shi, C., Cheng, M., Yang, X., Lu, Y., Yin, H., y cols. (2020). Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG Promotes Mouse Gut Microbiota Diversity and T Cell Differentiation. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.607735>
- Simón-Soro, A., y Mira, A. (2015). Solving the etiology of dental caries. *Trends in Microbiology*, 23(2), 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.10.010>
- Slavin, J. (2013). Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. *Nutrients*, 5(4), 1417-1435. <https://doi.org/10.3390/nu5041417>



- Söderling, E., y Pienihäkkinen, K. (2020). Effects of xylitol and erythritol consumption on mutans streptococci and the oral microbiota: a systematic review. *Acta Odontologica Scandinavica*, 78(8), 599-608. <https://doi.org/10.1080/00016357.2020.1788721>
- Sohail, M. U., Shabbir, M. Z., Steiner, J., Ahmad, D. S., Kamran, Z., y cols. (2016). Molecular analysis of the gut microbiome of diabetic rats supplemented with prebiotic, probiotic, and synbiotic foods. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*, 37. <https://doi.org/10.1007/s13410-016-0502-9>
- Stecksén-Blicks, C., Sjöström, I., y Twetman, S. (2009). 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 Research*, 43(5), 374-381. <https://doi.org/10.1159/000235581>
- Swanson, K. S., Gibson, G. R., Hutkins, R., Reimer, R. A., Reid, G., y cols. (2020). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 17(11), 687-701. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0344-2>
- Syed, S., Yassin, S. M., Dawasaz, A. A., Amanullah, M., Alshahrani, I., y cols. (2019). Salivary 1,5-Anhydroglucitol and Vitamin Levels in Relation to Caries Risk in Children. *BioMed Research International*, 2019, 4503450. <https://doi.org/10.1155/2019/4503450>
- Tada, A., y Miura, H. (2019). The Relationship between Vitamin C and Periodontal Diseases: A Systematic Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(14), 2472. <https://doi.org/10.3390/ijerph16142472>
- Tobar. (2022). *Efecto del Lacticaseibacillus rhamnosus sp1 en la progresión de caries en un modelo in situ*. Universidad de Chile - Facultad de Odontología.

- Twetman, S. (2018). Prevention of dental caries as a non-communicable disease. *European Journal of Oral Sciences*, 126(S1), 19-25. <https://doi.org/10.1111/eos.12528>
- Twetman, S., y Jørgensen, M. R. (2021). Can probiotic supplements prevent early childhood caries? A systematic review and meta-analysis. *Beneficial Microbes*, 12(3), 231-238. <https://doi.org/10.3920/BM2021.0008>
- Twetman, S., Jørgensen, M. R., y Keller, M. K. (2017). Fifteen Years of Probiotic Therapy in the Dental Context: What Has Been Achieved? *CDA journal California Dental Association*, 45(10), 539-545.
- Väänänen, M. K., Markkanen, H. A., Tuovinen, V. J., Kullaa, A. M., Karinpää, A. M., y cols. (1994). Dental caries and mutans streptococci in relation to plasma ascorbic acid. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 102(2), 103-108. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1994.tb01163.x>
- Valerio, F. (2023). *Efecto del uso del probiótico lacticaseibacillus rhamnosus gg en la microdureza superficial del esmalte en un modelo in vitro de caries.*
- Wade, W. G. (2013). The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research*, 69(1), 137-143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.006>
- Wang, Fan, Y., Qian, J., Wang, S., Li, Y., y cols. (2022). Relationship Between Dietary Fiber and Vitamin C Intake and Oral Cancer. *Frontiers in Public Health*, 10, 880506. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.880506>
- Wang, Q., Zhang, W., Li, H., Apreccio, R., Wu, W., y cols. (2013). Effects of 25-hydroxyvitamin D3 on cathelicidin production and antibacterial function of human oral keratinocytes. *Cellular Immunology*, 283(1), 45-50. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.06.007>
- Waterhouse, M., Hope, B., Krause, L., Morrison, M., Protani, M. M., y cols. (2019). Vitamin D and the gut microbiome: a systematic review of in vivo studies.

*European Journal of Nutrition*, 58(7), 2895-2910.  
<https://doi.org/10.1007/s00394-018-1842-7>

Wattanarat, O., Makeudom, A., Sastraruji, T., Piwat, S., Tianviwat, S., y cols. (2015). Enhancement of salivary human neutrophil peptide 1–3 levels by probiotic supplementation. *BMC Oral Health*, 15(1), 19.  
<https://doi.org/10.1186/s12903-015-0003-0>

Wen, P. Y. F., Chen, M. X., Zhong, Y. J., Dong, Q. Q., y Wong, H. M. (2022). Global Burden and Inequality of Dental Caries, 1990 to 2019. *Journal of Dental Research*, 101(4), 392-399. <https://doi.org/10.1177/00220345211056247>

Wu, X., Hou, J., Chen, X., Chen, X., y Zhao, W. (2016). Identification and functional analysis of the L-ascorbate-specific enzyme II complex of the phosphotransferase system in *Streptococcus mutans*. *BMC Microbiology*, 16(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0668-9>

Yadav, M. K., Kumari, I., Singh, B., Sharma, K. K., y Tiwari, S. K. (2022). Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(2), 505-521.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-021-11646-8>

Yamamoto, E. A., y Jørgensen, T. N. (2019). Relationships Between Vitamin D, Gut Microbiome, and Systemic Autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, 10, 3141.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03141>

Yu, O. Y., Lam, W. Y.-H., Wong, A. W.-Y., Duangthip, D., y Chu, C.-H. (2021). Nonrestorative Management of Dental Caries. *Dentistry Journal*, 9(10), 121.  
<https://doi.org/10.3390/dj9100121>

Zero, D. T. (1995). In situ caries models. *Advances in Dental Research*, 9(3), 214-230; discussion 231-234. <https://doi.org/10.1177/08959374950090030501>

Zero, D. T., Fu, J., Anne, K. M., Cassata, S., McCormack, S. M., y cols. (1992). An Improved Intra-oral Enamel Demineralization Test Model for the Study of

Dental Caries. *Journal of Dental Research*, 71(3\_suppl), 871-878.  
<https://doi.org/10.1177/002203459207100S17>

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., y cols. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782-2858.  
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

Zúñiga, M., Yebra, M. J., y Monedero, V. (2021). Complex Oligosaccharide Utilization Pathways in *Lactobacillus*. *Current Issues in Molecular Biology*, 49-80. <https://doi.org/10.21775/cimb.040.049>

## 11. ANEXOS Y APÉNDICES

### Anexo 1: Consentimiento informado para 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.



## Anexo 2: Certificado de inscripción FonDOR 2022/02



### CARTA – CERTIFICADO DE INSCRIPCIÓN DE PROYECTO FONDOR

Santiago, 2 de mayo de 2022

Mat. Asigna Código FONDOR 2022/02.

#### **Dr. GONZALO RODRÍGUEZ MARTÍNEZ**

Investigador Responsable Proyecto FONDOR

Departamento de Odontología Restauradora

Facultad de Odontología

PRESENTE

Estimado Dr. Rodríguez:

Informo a usted que con fecha 2 de mayo de 2022, el Proyecto FONDOR titulado: “Efecto del Uso de Probióticos No Lactobacillus en la Microdureza Superficial y Densidad Mineral de Esmalte en un Modelo In Vitro de Caries”, del cual usted es el Investigador Responsable, ha quedado inscrito en la DIFO con el **Código FONDOR 2022/02**, autorizándose su ejecución a partir del 3 de mayo del año en curso.

A partir de la Fecha de Registro del Proyecto, usted debe considerar el periodo de duración del Proyecto FONDOR de 18 meses, por lo tanto,

Fecha de Entrega Informe Final:	2 de noviembre de 2023.
---------------------------------	-------------------------

Deseándole el mayor de los éxitos tanto a usted como a su Equipo de Colaboradores, se despide cordialmente,



**DR. ALFREDO MOLINA BERRÍOS**

*Director de Investigación*

*Facultad de Odontología - Universidad de Chile*

AMB/rcm.