

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

MAESTRÍA EN ENDODONCIA

**“EFECTO ANTIMICROBIANO DE *BACILLUS CLAUSII* EN
BIOFILM DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* Y BIOFILM DE
CANDIDA ALBICANS”**

AUTOR

C.D. ZAIRA REYES MÉNDEZ

Tesis presentada para optar por el título de Maestra en Endodoncia

Julio 2023, San Luis Potosí, México. Todos los derechos reservados

DIRECTOR DE TESIS.....PhD. Alejandro López Aldrete

ASESORA..... MSc. Ana María González Amaro

ASESORA.....MSc. María Verónica Méndez González



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
MAESTRÍA EN ENDODONCIA

**“EFECTO ANTIMICROBIANO DE *BACILLUS CLAUSII* EN
BIOFILM DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* Y BIOFILM DE
CANDIDA ALBICANS”**

C.D. ZAIRA REYES MÉNDEZ

Tesis presentada para optar por el título de Maestra en Endodoncia

Julio 2023, San Luis Potosí, México. Todos los derechos reservados

DIRECTOR DE TESIS.....**PhD. Alejandro López Aldrete**
Profesor – Investigador
Maestría en Endodoncia, UASLP
San Luis Potosí, SLP, México

ASESORA..... **MSc. Ana María González Amaro**
Profesor – Investigador
Maestría en Endodoncia, UASLP
San Luis Potosí, SLP, México

ASESORA..... **MSc. María Verónica Méndez González**
Profesor – Investigador
Maestría en Endodoncia, UASLP
San Luis Potosí, SLP, México



En la Vanguardia por la excelencia...

“EFECTO ANTIMICROBIANO DE *BACILLUS CLAUSII* EN BIOFILM DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* Y BIOFILM DE *CANDIDA ALBICANS*”

C.M.F. Ricardo Martínez Rider

Director de la Facultad de Estomatología, UASLP

PhD. Yolanda Hernández Molinar

Jefa de la División de Posgrados de la Facultad de Estomatología

MSc. María Verónica Méndez González

Coordinadora de la Maestría en Endodoncia

San Luis Potosí, Julio 2023



“EFECTO ANTIMICROBIANO DE *BACILLUS CLAUSII* EN BIOFILM DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* Y BIOFILM DE *CANDIDA ALBICANS*”

Trabajo de grado aprobado para su presentación en el nombre de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Estomatología, Maestría en Endodoncia, por el siguiente jurado:

PhD. Ricardo Oliva Rodríguez

PRESIDENTE

MSc. Karla Patricia Navarrete Olvera

SECRETARIA

PhD. Alejandro López Aldrete

VOCAL

San Luis Potosí, Julio 2023



“EFECTO ANTIMICROBIANO DE *BACILLUS CLAUSII* EN BIOFILM DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* Y BIOFILM DE *CANDIDA ALBICANS*”

Trabajo de grado aprobado para su presentación en el nombre de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Estomatología, Maestría en Endodoncia, por la siguiente dirección y asesorías:

PhD. Alejandro López Aldrete

DIRECTOR DE TESIS

MSc. Ana María González Amaro

ASESORA

MSc. María Verónica Méndez González

ASESORA

San Luis Potosí, Julio 2023

Agradecimientos

En primer lugar, a todos los que han sido partícipes de este proyecto de tesis, quiero reiterar mis más sinceros agradecimientos.

A mi asesora, la Maestra Anita, por no desistir, por ser siempre positiva en el laboratorio y fuera de él, por impulsar mi curiosidad, mis ganas de aprender, por ver soluciones en lugar de problemas.

A mi director de tesis, el Dr. Alejandro por ser guía durante este largo proceso, por confiar en mis propuestas, por no dudar de este proyecto, y por estar siempre disponible y abierto a los cambios.

A la coordinadora de esta maestría y asesora de este proyecto, Dra. Verónica Méndez, por su apoyo, interés y participación en esta investigación.

A la Dra. Verónica Zavala por participar en este proyecto desinteresadamente, por permitirnos hacer uso de las instalaciones y equipo del laboratorio de Ciencias Odontológicas.

A la Dra. Selene por estar siempre dispuesta a aportar a este proyecto, transmitiéndonos todo lo que sabe, por todas las horas extras que nos regaló, por la dedicación que pone en el laboratorio y en nuestros trabajos.

A las pasantes de servicio de Ciencias químicas y de la Maestría por ser apoyo en el laboratorio durante la fase experimental de este proyecto.

Agradezco a los catedráticos que fueron parte de mi formación durante estos dos años de maestría Dr. Ricardo, Dr. Alejandro, Dr. Fernando, Dra. Vero, Dra. Claudia y todos los demás docentes que estuvieron compartiendo sus conocimientos y experiencias conmigo.

A mis instructores de clínica de primer y segundo año: Dra. Odeth, Dra. Claudia, Dr. Fer, Dra. Erika, Dra. Aura, Dr. Alejandro, Dr. Ducoing, Dra. Karlita, y Dra. Lupita por ser mi inspiración diaria, por transmitirme toda esa pasión y dedicación que tienen por la Endodoncia.

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

A mis compañeros de generación E-XXX Fer, Aída, Pao, Lili, Katia, Dani y Keni porque caminamos juntos durante estos dos años llenos de emociones, de conocimiento, de alegría y también tristeza, fue un gusto compartir con ustedes y me siento muy orgullosa de nuestra generación. A Keni por ser la Potosina más cálida que pude conocer, agradezco tu cariño, tu solidaridad y ayuda desde el día uno. A Lili por ser mi vecina, consejera, cómplice de tragedias y victorias y la animadora número uno. A Dani por estar siempre disponible para mí, por darme ánimos, por todas esas aventuras que pasamos juntas y por hacerme sentir en casa.

A la Sra. Lupita y Puppy por ser cobijo y refugio durante estos dos años.

Agradezco infinitamente a mi familia, a mi mamá, a mi hermana por ser cómplices y patrocinadoras de este gran sueño, por confiar en mí en todo momento, por su amor incondicional y por su apoyo desde casa, nunca me sentí sola porque siempre están conmigo. A mi papá que, aunque físicamente no puede verme logrando este sueño, sé que está orgulloso y celebrando por mí. A todos mis tíos y primos, que se emocionaron y se alegraron por verme cumplir este sueño.

Agradezco el haber cumplido mi sueño de ser Endodoncista en esta institución, porque sé que aquí es mi lugar, sin lugar a duda estos dos años cambiaron mi vida para bien, me siento muy orgullosa y agradecida de todo lo que aprendí.

“Efecto antimicrobiano de bacillus clausii en biofilm de enterococcus faecalis y biofilm de candida albicans” © 2023 by Zaira Reyes Méndez is licensed under [CC BY-NC-ND 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

**“PROYECTO APOYADO POR EL
PROGRAMA NACIONAL DE BECAS
CONACYT CON CLAVE: 2021-000018-
02NACF/ CVU:1103981”**

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

EFFECTO ANTIMICROBIANO DE *BACILLUS CLAUSII* EN BIOFILM DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* Y BIOFILM DE *CANDIDA ALBICANS*

C.D. Zaira Reyes Méndez
Maestría en Endodoncia
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Introducción: El empleo de probióticos como terapia antimicrobiana ofrece beneficios que los tratamientos con antibióticos o las terapias con medios físicos o químicos no presentan. En los últimos años se ha expandido su investigación a otras áreas de la salud humana, como la endodoncia, donde se han evidenciado características, que los hacen candidatos para competir con microorganismos de gran virulencia como *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. **Objetivo:** Evaluar el efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en forma vegetativa y esporulada en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*. **Materiales y Métodos:** Se estandarizó la metodología para la conversión de esporas de *Bacillus clausii* (Enterogermina®) a su forma vegetativa, subsecuentemente se pusieron en contacto ambas morfologías del probiótico individualmente con *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* en estado planctónico para obtener la concentración más efectiva del probiótico con ambos microorganismos, posteriormente se formó biofilm por flujo laminar donde se pusieron en contacto 1 mL de *B. clausii* (en forma esporula y vegetativa a concentración 7.0 McFarland) con 1mL de los microorganismos patógenos por separado evaluados en dos intervalos de tiempo: 6 y 20 días, por último se realizó la observación en microscopio electrónico de barrido. El análisis estadístico se realizó, con la prueba chi cuadrado para evaluar asociación entre variables y V de Cramér para el grado de asociación, en software SPSS versión 29 de marca comercial IBM. **Resultados:** En los grupos de *Enterococcus faecalis* con *B. clausii* en ambas morfologías e intervalos de tiempo no se observó una disminución clara de la presencia del microorganismo, sin embargo, fue constante la existencia de esporas de *B. clausii*, *contrario a lo observado en los grupos de C. albicans*, donde se observó mayor presencia de *B. clausii* tanto de forma esporulada o vegetativa que del microorganismo patógeno, además se *C. albicans* tuvo pérdida de estructura y pared celular discontinua. La evaluación estadística se realizó con la prueba chi cuadrado para determinar asociación entre variables y V de Cramér para el valor de la asociación. **Conclusión:** *Bacillus clausii* en forma esporulada y vegetativa tiene una mayor acción sobre *C. albicans* que sobre *E. faecalis*. **Palabras clave:** Efecto antibacteriano, probióticos, *Bacillus clausii*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*.

ÍNDICE

Introducción.....	1
1. MARCO TEÓRICO.....	2
1.1 Enfermedad Infecciosa.....	2
1.2 Tipos de Infección Endodóntica.....	4
1.3 Especies bacteriana presentes en infecciones persistentes.....	5
1.3.1 <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Candida albicans</i> en infecciones persistentes.....	6
1.4 Formas de Organización Bacteriana.....	11
1.5 BIOFILM.....	12
1.5.1 Formación del Biofilm.....	15
1.6 Estrategias para combatir el Biofilm.....	17
1.7 Probióticos.....	19
1.7.1 Mecanismo de acción.....	21
1.7.2 <i>Bacillus</i>	25
2. JUSTIFICACIÓN.....	29
2.1 Pregunta de Investigación.....	29
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 General.....	30
3.2 Específicos.....	30
4. HIPÓTESIS.....	30
5. METODOLOGÍA.....	31
5.1 Lugar de realización.....	31
5.2 Diseño de estudio.....	31
5.3 Criterios de Selección.....	31
5.3.1 Inclusión.....	31
5.3.2 Exclusión.....	31
5.3.3 Eliminación.....	32
5.4 Definición Conceptual y Operacional de variables.....	32
5.4.1 Independientes.....	32

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

5.4.2 Dependientes.....	33
5.5 Análisis Estadístico.....	34
5.6 Consideraciones Éticas.....	34
5.7 Fase Experimental.....	35
6.0 RESULTADOS.....	50
7.0 DISCUSIÓN.....	71
8.0 CONCLUSIONES.....	75
9.0 PERSPECTIVAS.....	75
10.0 REFERENCIAS.....	76
11.0 ANEXOS.....	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Prevalencia de especies bacterianas en infecciones persistentes.....	7
Tabla 2. Clases de agentes antibiofilm y sus funciones.....	18
Tabla 3. Cepas de <i>Bacillus</i> mayormente examinadas como probióticos.....	25
Tabla 4. Agrupación de muestras para Grupos de <i>Enterococcus faecalis</i>	36
Tabla 5. Agrupación de muestras para grupos de <i>Candida albicans</i>	37
Tabla 6. Escala de puntuación para imágenes de MEB.....	67
Tabla 7. Puntajes Obtenidos en los grupos de <i>Enterococcus faecalis</i> con <i>Bacillus clausii</i> de forma vegetativa y esporulada.....	67
Tabla 8. Prueba chi-cuadrado para resultados de Grupos de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Bacillus clausii</i> de forma vegetativa y esporulada	68
Tabla 9. Nivel de asociación entre variables.....	68
Tabla 10. Prueba chi- cuadrado para evaluar asociación en el tiempo de contacto y la presencia de <i>E. faecalis</i>	68
Tabla 11. Puntaje para los grupos con <i>Candida albicans</i> y <i>Bacillus clausii</i> en forma vegetativa y esporulada	69
Tabla 12. Pruebas de chi-cuadrado para evaluar asociación entre dos variables	69
Tabla 13. Nivel de asociación entre dos variables.....	70
Tabla 14. Prueba chi-cuadrado para asociación entre variables tiempo y presencia del microorganismo	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Papel de los microorganismos en infecciones endodónticas.....	3
Figura 2. Tipos de infección intrarradicular.....	4
Figura 3. Mecanismos de supervivencia de <i>E. faecalis</i>	8
Figura 4. Factores de virulencia de <i>C. albicans</i>	10
Figura 5. Formas de organización Bacteriana.....	11
Figura 6. Biofilm intrarradicular.....	13
Figura 7. Biofilm bacteriano extrarradicular de origen Endodóntico.....	13
Figura 8. Formación del Biofilm.....	15
Figura 9. Representación esquemática de la acción de los agentes en las diferentes etapas de formación del biofilm.....	18
Figura 10. Mecanismo de acción de probióticos.....	21
Figura 11. Aplicaciones de los probióticos en la salud humana.....	24
Figura 12. Propiedades benéficas de <i>Bacillus sp</i>	26
Figura 13. Secuencia de procedimientos a realizar.....	35
Figura 14. Estandarización de las muestras.....	36
Figura 15. Confirmación de pureza de microorganismo <i>E. faecalis</i>	38
Figura 16. Confirmación de pureza de microorganismo <i>C. albicans</i>	38
Figura 17. Presentación comercial <i>B. clausii</i> , Enterogermina®.....	39
Figura 18. Tubos con solución salina estériles rotulados de acuerdo con reducción logarítmica	40
Figura 19. Diluciones seriadas de <i>B. clausii</i>	40
Figura 20. Concentraciones seleccionadas y colocación en medio.....	41
Figura 21. Siembra e incubación de <i>B. clausii</i>	41
Figura 22. Prueba de contacto entre <i>E. faecalis</i> y <i>B. clausii</i>	42
Figura 23. Formación de Biofilm <i>B. clausii</i> + <i>E. faecalis</i>	44
Figura 24. Control negativo y positivo.....	45
Figura 25. Formación de Biofilm <i>B. clausii</i> + <i>C. albicans</i>	46
Figura 26. Grupos Experimentales.....	47

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

Figura 27. Sección de las muestras con disco de diamante.....	48
Figura 28. Fijación de muestras, deshidratación en alcoholes a porcentajes crecientes y secado a punto crítico	49
Figura 29. Recubrimiento de oro.....	49
Figura 30. Observación macroscópica de esporas de <i>B. clausii</i>	50
Figura 31. Observación de esporas de <i>B. clausii</i> en proceso de germinación.....	51
Figura 32. <i>Bacillus clausii</i> en estado vegetativo a diferentes escalas.....	52
Figura 33. Desarrollo de <i>Bacillus clausii</i> a 24 horas de germinación.....	53
Figura 34. Tinciones Gram observadas en microscopio óptico a 100X, 24 horas después del contacto entre microorganismos.....	54
Figura 35. Tinciones Gram observadas en microscopio óptico a 100X.....	55
Figura 36. Observación macroscópica de muestras post formación de Biofilm.....	56
Figura 37. Control negativo y positivo	57
Figura 38. Micrografías de Grupo 1A.....	58
Figura 39. Micrografías grupo 1B.....	59
Figura 40. Biofilm maduro con presencia tanto de bacilos, esporas.....	60
Figura 41. Micrografías Grupo 2B.....	61
Figura 42. Control negativo.....	62
Figura 43. Control de formación de Biofilm.....	62
Figura 44. Micrografías Grupo 3 ^a	63
Figura 45. Grupo 3B En todas las muestras se observó colonización de <i>Bacillus clausii</i>	64
Figura 46. Grupo 4A.....	65
Figura 47. Grupo 4B.....	66

INTRODUCCIÓN

El empleo de probióticos como terapia antimicrobiana ofrece beneficios que los tratamientos con antibióticos o las terapias con medios físicos o químicos no presentan, su uso ha sido principalmente corroborado en enfermedades gastrointestinales, sin embargo, en los últimos años se ha expandido su investigación a otras áreas de la salud humana, evidenciando su mecanismo de acción, su capacidad de supervivencia en ambientes desfavorables, su aptitud para producir péptidos antimicrobianos, su habilidad para competir y suprimir microorganismos patógenos, entre otras.

Estas características los hacen candidatos para competir con microorganismos persistentes de alta virulencia, como lo son *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* dos de los microorganismos mayormente prevalentes en infecciones persistentes en el área de Endodoncia. Existen algunos reportes como los de Kumar y cols.(1) o los de Bohora y cols.(2) quienes sugieren que los probióticos son efectivos para prevenir el crecimiento de estos patógenos endodónticos, no obstante, es requerida mayor investigación que sustente su uso y ayude a dilucidar su mecanismo de acción dentro del conducto radicular. Por lo anterior surge el presente trabajo con la finalidad de evaluar el efecto antimicrobiano y observar el comportamiento del probiótico *Bacillus clausii*, en dos procesos fisiológicos diferentes en forma de esporas y en forma vegetativa, con los microorganismos *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* a diferentes intervalos de tiempo, mediante su seguimiento con imágenes de microscopio óptico y micrografías electrónicas. Nuestros resultados pretenden ampliar y progresar en la investigación de los probióticos como antimicrobianos en la terapia endodóntica.

1.MARCO TEÓRICO

1.1 Enfermedad infecciosa

Las enfermedades infecciosas generalmente ocurren cuando un agente patógeno infecta a un huésped susceptible y produce un factor de virulencia específico que lo dañará, causando signos y síntomas. En la mayoría de las enfermedades, no se identifica a solo un patógeno como agente causal, sino que realmente es el resultado de una interacción aberrante entre el huésped y la microbiota normal residente. Se ha sugerido que un cambio en la composición del microbioma puede llevar a una disbiosis, y subsecuentemente a una enfermedad. La susceptibilidad del huésped juega un rol principal, ya que su aumento es causado por pequeñas diferencias en la respuesta inmune e inflamatoria, así como por otros factores como el estrés, la dieta y componentes sociales. La enfermedad aparece cuando se rompe la comunicación y la cooperación entre el huésped y la microbiota comensal, resultando en un daño al huésped.

En las enfermedades infecciosas del complejo dentino-pulpar y de los tejidos periapicales ocurre lo mismo, siendo el tratamiento en este caso la terapia endodóntica. Las causas de enfermedad pulpar y periapical son muy variables, se asocian principalmente a caries, es decir a causas bacterianas. El manejo se ha enfocado siempre en la reacción inflamatoria de la pulpa dental y de los tejidos periapicales(3).

El diagnóstico de la infección pulpar debe dar una descripción precisa de la extensión y severidad de la inflamación para permitir la selección adecuada del tratamiento. Intervenir correctamente una situación aguda es importante, no solo para eliminar el dolor y reestablecer la función, sino también para reducir el riesgo de la diseminación de la infección y el establecimiento de una lesión crónica. Es evidente que a mayor tiempo de una lesión periapical el pronóstico para el éxito del tratamiento es peor que para un diente con pulpa vital sin lesión. El fracaso de un tratamiento primario facilita el desarrollo de una infección secundaria que reduce el pronóstico del tratamiento(3,4).

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

Diversos factores pueden influir en la perpetuación de este tipo de infecciones, en primer lugar, los microorganismos. Kakehashi y cols.(5), Sundqvist y cols(3)., Moller y cols.(6) demostraron con anterioridad que su presencia es necesaria para el desarrollo y persistencia de una infección endodóntica y periodontitis apical (Fig.1). Cuando invaden la compleja anatomía del sistema de conductos radiculares, no pueden ser totalmente eliminados a pesar de la preparación quimio mecánica, o los protocolos de irrigación, ocasionando que puedan sobrevivir, multiplicarse y desencadenar infecciones secundarias o persistentes(3).

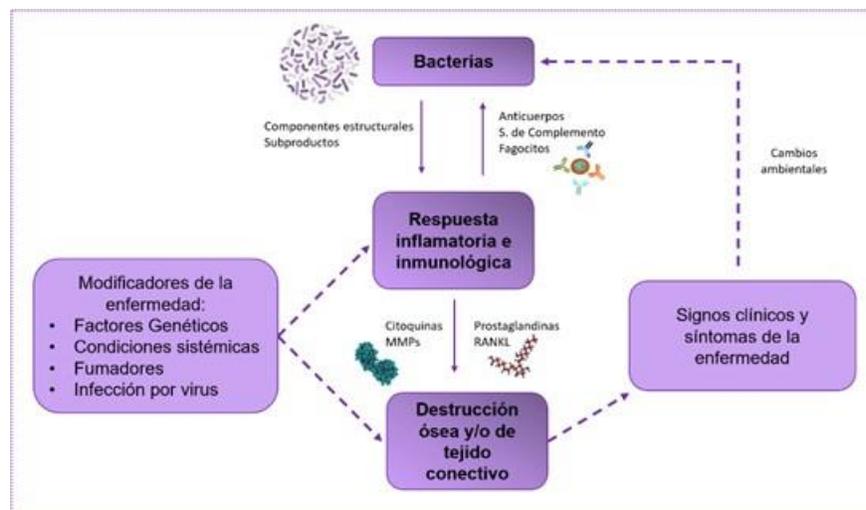


Fig. 1 Papel de los microorganismos en infecciones endodónticas/ Siqueira Jr. José F, Rocas Isabela N. Treatment of Endodontic Infections. 2ª Ed. Alemania: Quintessence Publishing; 2022(2).

Otro factor importante es el diagnóstico inicial pulpar y periapical, estudios de seguimiento (Smith y cols.(7); Siqueira y cols.(4)) han documentado una correlación para dientes con un diagnóstico inicial de periodontitis apical, y la persistencia de lesiones periapicales en un 20 a 25% de los casos, asumiendo que menos del 50% de los casos con periodontitis apical se curan con el tratamiento convencional. La calidad de la obturación también juega un rol principal en la persistencia de este tipo de infecciones, como lo han esclarecido los trabajos de Ricucci y cols.(8), Sjögren y cols.(9), Smith y cols. (7), Swartz y cols.(10), Holland y cols.(11), quienes han

correlacionado las obturaciones deficientes con la presencia de periodontitis apical e infecciones persistentes.

Gomes y cols.(12), Sun y cols.(13) han confirmado que en este tipo de infección endodóntica avanzada las bacterias son de naturaleza polimicrobiana y que se encuentran organizadas en comunidades bacterianas, reconocidas como estructuras tipo biofilm(13,14) Estas comunidades se encuentran mezcladas y adheridas a las paredes radiculares tanto interna como externamente. Basado en este concepto el resultado de la enfermedad está relacionado con la patogenicidad colectiva de las comunidades bacterianas, lo que dependerá de la composición, abundancia e interacción entre las especies que forman la comunidad(4).

1.2 Tipos de Infección Endodóntica

La infección intraradicular puede ser subclasificada como primaria, secundaria o persistente (Fig.2)



Fig. 2 Tipos de infección intraradicular/ Siqueira Jr. José F, Rocas Isabela N. Treatment of Endodontic Infections. 2ª Ed. Alemania: Quintessence Publishing; 2022(2).

Las infecciones persistentes y secundarias son responsables de múltiples problemas clínicos, incluyendo el exudado persistente, síntomas, exacerbación entre citas y periodontitis apical post tratamiento, lo cual caracteriza el fracaso del tratamiento endodóntico(3).

La mayoría de las infecciones secundarias y persistentes son clínicamente indistinguibles a excepción de complicaciones infecciosas que surgen después del tratamiento de pulpas vitales no infectadas o casos en los cuales la periodontitis apical estuvo ausente al momento del tratamiento, pero presente en radiografías de seguimiento. Ambos son típicos ejemplos de infecciones secundarias(3,4).

1.3 Especies Bacterianas presentes en infecciones persistentes

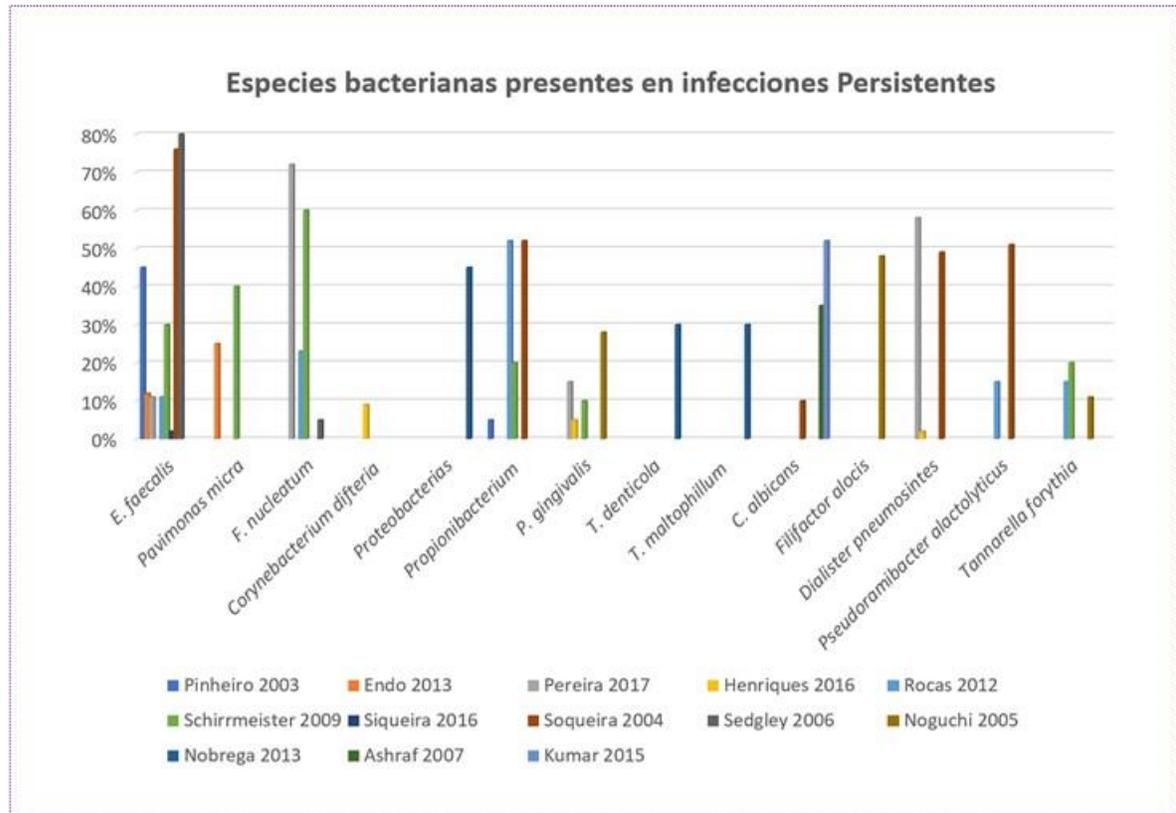
El éxito o fracaso del tratamiento endodóntico es evaluado por signos clínicos y síntomas, así como por hallazgos radiográficos. Los signos clínicos y síntomas que definen el éxito son: ausencia de dolor, desaparición de inflamación y fístula, así como el mantenimiento del diente en función en el alveolo, radiográficamente sin lesión periapical y con una lámina dura de apariencia normal dentro de un periodo de 6 a 24 meses post tratamiento(4). Los factores más frecuentes asociados con fracaso del tratamiento se deben a presencia de bacterias (intra y extrarradiculares), una preparación químico mecánica deficiente, inadecuada obturación del sistema de conductos con filtración apical, restauraciones desajustadas, conductos no tratados, así como iatrogenias (transportación apical, accesos demasiado pequeños, perforaciones, falsas vías, o fractura de instrumentos)(15). El principal problema es que, en la mayoría de los casos, los factores anteriormente mencionados, permiten la percolación de fluidos tisulares ricos en glicoproteínas, que proporcionan un sustrato para los microorganismos remanentes, permitiéndoles proliferar y alcanzar un número suficiente para generar o perpetuar una lesión periapical.

Para sobrevivir en el conducto, los microorganismos deben resistir a los procesos de desinfección y tienen que adaptarse a un ambiente con pocos nutrientes disponibles(16), aunque sobrevivan no siempre son capaces de provocar el fracaso endodóntico, esto solo ocurre si las bacterias (sus toxinas y sus endotoxinas) son patógenas, si alcanzan un número suficiente y si acceden a los tejidos perirradiculares para inducir o perpetuar las lesiones. Zargar y cols.(16), Pereira y cols.(17) analizaron la composición de biopelículas de conductos radiculares de dientes con periodontitis apical después de un tratamiento endodóntico, con resultados heterogéneos en cuanto a presencia de patógenos en casos de fracaso, reportaron alta prevalencia de *E.*

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

faecalis, *F. nucleatum*, *Propionibacterium*, *C. albicans*, *Dialister pneumosintes*, entre otros (Gráfico 1) (16,17)

Gráfico 1. Especies bacterianas presentes en infecciones persistentes/ Pereira RS, Rodrigues VAA, Furtado WT, Gueiros S, Pereira GS, Avila-Campos MJ. Microbial analysis of root canal and periradicular lesion associated to teeth with endodontic failure. Anaerobe. 2017;48:12–8(17).



1.3.1 *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* en infecciones persistentes

Enterococcus faecalis

Dioguardi y cols.(18), Siqueira y cols.(19) reportaron alta prevalencia de especies de enterococos en infecciones persistentes, siendo *Enterococcus faecalis* la especie más reportada de este género. De acuerdo con Zargar y cols.(16) *E. faecalis* y *Prevotella pallens* tuvieron la mayor y menor prevalencia en rangos de 63.33% y 6.66% respectivamente, encontraron que en lesiones periapicales menores de 5 mm

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

E. faecalis era más prevalente (80%) que en lesiones periapicales mayores a 5 mm (46.7%) (Tabla 1).

Tabla 1. Prevalencia de especies bacterianas en infecciones persistentes/ Zargar N, Marashi MA, Ashraf H, Hakopian R, Beigi P. Identification of microorganisms in persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings: bacterial culture and molecular detection. Iran J Microbiol. 2019;11(2):120-128.(16)

Especies	Dientes con lesiones de PA <5 mm	Dientes con lesiones de PA >5 mm	Total
<i>Treponema denticola</i>	6 (40%)	6 (40%)	12 (40%)
<i>Streptococcus mitis</i>	5(33.3%)	5 (33.3%)	10 (33.33%)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	3 (20%)	5 (33.3%)	8 (26.70%)
<i>Streptococcus salivarius</i>	7 (46.7%)	8 (53.3%)	15 (50%)
<i>Prevotella intermedia</i>	1 (6.7%)	5 (33.3%)	6 (20%)
<i>Tannerella forsythia</i>	7 (46.7%)	6 (40%)	13 (43.33%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	12 (80%)	7 (46.7%)	19 (63.33%)
<i>Eikenella corrodens</i>	2 (13.3%)	2 (13.3%)	4 (13.33%)
<i>Treponema parvum</i>	3 (20%)	3 (20%)	6 (20%)
<i>Atopobium parvulum</i>	0 (0%)	3 (20%)	3 (10%)
<i>Dialister invisus</i>	8 (53.3%)	8 (53.3%)	16 (53.33%)
<i>Prevotella pallens</i>	0 (0%)	2 (13.3%)	2 (6.66%)
<i>Candida albicans</i>	6 (40%)	4 (26.7%)	10 (33.33%)
HSV-1	6 (40%)	4 (26.7%)	10 (33.33%)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	6 (40%)	4 (26.7%)	10 (33.33%)

Kaufman y cols.(20) previamente señalaron de igual manera mayor prevalencia de *E. faecalis* en dientes tratados endodónticamente sin lesiones periapicales(12.1%), Pinheiro y cols.(21) observaron que es estadísticamente el microorganismo más prevalente (45.8%) en conductos previamente tratados, seguido por *Fusobacterium* (6.7%), Siqueira y cols.(19) y Sedgley y cols.(22) mediante técnicas de PCR encontraron resultados similares observando una prevalencia de un 77% y 79.5%, además notaron que su presencia es más frecuente en infecciones secundarias en un 89.6% que en infecciones primarias en un 67.5% con diferencias estadísticamente significativas. Contrario a los anteriores, en los trabajos de Endo y cols.(23); Pereira y cols.(17); Henriques y cols.(24); Rôças y cols.(25); Schirmeister y cols.(26); Siqueira y cols.(27), *E. faecalis* no fue la especie más prevalente, pero siempre estuvo presente

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

en pequeños porcentajes: 13.33%(23), 11.6%(17), 0.52%(24), 12%(25), 30%(26), 1.9%(27).

Por su papel dominante este microorganismo ha sido estudiado ampliamente para comprender los mecanismos que le dan resistencia y supervivencia(16).

Enterococcus faecalis es un coco grampositivo que forma parte de la flora comensal del tracto gastrointestinal, se agrupa en cadenas cortas o en pares, es anaerobio facultativo clasificable como patógeno oportunista. Tiene diferentes mecanismos que le permiten sobrevivir a ambientes desfavorables (Fig.3)(18,27).

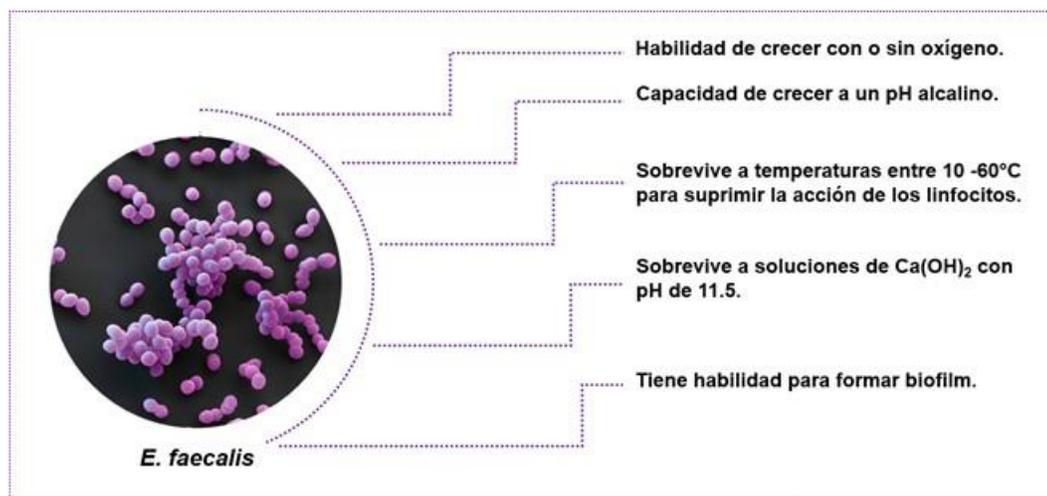


Fig. 3 Mecanismos de supervivencia de *E. faecalis*/ Siqueira JF, Antunes HS, Rôç IN, Rachid CTCC, Alves FRF. Microbiome in the apical root canal system of teeth with post-treatment apical periodontitis. PLoS One. 2016;11:1–14.(27)

A estos mecanismos de defensa se agregan su habilidad para subsistir sin nutrientes, su supervivencia en presencia de medicación intraconducto, su resistencia a antibióticos como eritromicina y azitromicina(21,28), puede invadir túbulos dentinarios, utiliza fluidos del ligamento periodontal como nutrientes y se adhiere al colágeno. El rol del colágeno varía dependiendo en si es inmovilizado el colágeno tipo I o el colágeno libre: el primero aumenta la capacidad de *E. faecalis* para adherirse a la dentina, mientras que el segundo inhibe su capacidad de adhesión(21,29). Stuart y cols.(30) añaden la capacidad de alterar la respuesta del huésped, poseer enzimas líticas, mantener en homeostasis el pH, competir con otras células, y utilizar el suero

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

como fuente de nutrientes. El suero humano garantiza su viabilidad, permitiendo su adhesión a la dentina e invasión de los túbulos dentinarios. Tiene la capacidad de sobrevivir a concentraciones de NaClO de hasta 6.5%, puede adquirir y compartir elementos extra cromosómicos, codificar factores de virulencia, producir cambios patológicos secretando endotoxinas que provocan respuestas inflamatorias, produce precipitación de hidroxapatita en biofilm maduro, para formar una biopelícula calcificada y adherirse a la dentina (29–31), es capaz de sobrevivir sin ayuda de otra bacteria, posee sustancias de agregación y adhesinas de superficie, ácido lipoteicoico, superóxido extracelular, gelatinasa, hialuronidasa y citolisina. Tiene un inhibidor de la bomba de protones en funcionamiento (CCCP) que es el mecanismo más importante que le permite regular el pH. Cuando el pH, por la aplicación de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (4), se vuelve muy alcalino, esta bomba se activa y permite transportar protones al interior de la célula para acidificar el citoplasma y, por tanto, permitir que la célula sobreviva(32,33).

Candida albicans

La transición de *Candida* de patógeno comensal oral no dañino a un patógeno oportunista depende de una variedad de condiciones predisponentes, incluyendo la función inmune, desordenes endócrinos, prótesis mal ajustadas, higiene oral deficiente, uso de antibióticos de amplio espectro, corticoesteroides, agentes inmunosupresores y drogas. Las especies de *Candida*, en general, poseen diversos factores de virulencia (Fig.4) incluyendo la adhesión y formación de biofilm en superficies bióticas y abióticas del huésped, mediadas por moléculas de superficie, producción de enzimas hidrolíticas, proteinasas, fosfolipasas, y hemolisinas, las cuales degradan las proteínas de la matriz extracelular de los tejidos del huésped, tigmotropismo, cambio fenotípico y consecuente adaptación al ambiente, evasión del sistema inmune del huésped, mediante la degradación de Ig2, IgA1, IgA2, supresión de las funciones de neutrófilos polimorfonucleares, inmunomodulación a través de la estimulación de la síntesis de citoquinas proinflamatorias y activación de la cascada del complemento(34,35).

Siqueira y cols., 2002 apuntan a un papel crítico de *Candida* en la patogénesis de las infecciones endodónticas, al ser eucariota microaerófilo, posee el arsenal metabólico

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

necesario para sobrevivir dentro del ecosistema del conducto radicular(36). Los trabajos de Kinirons y cols.(37), demostraron que su penetración en los túbulos dentinarios *in vivo* se ve facilitada por la presencia de un barrillo dentinario producido por la instrumentación, el permanecer dentro los túbulos le da protección de los instrumentos, los irrigantes y la medicación (35,37). Los hongos pueden contribuir hasta en una de cada diez o una de cada once infecciones y reinfecciones del conducto radicular, con tasas de prevalencia similares tanto en las infecciones primarias (9,0%) como en las secundarias (9,3%), en casos de infecciones persistentes, la presencia de levaduras fue reportada en un rango entre 0.00 y 42.86%(38).



Fig. 4 Factores de virulencia de *C. albicans*/ Persoon, I. F., Crielaard, W., & Özok, A. R. (2017). Prevalence and nature of fungi in root canal infections: a systematic review and meta-analysis. International endodontic journal, 50(11), 1055–1066.(39)

C. albicans está mayormente presente en dientes con lesiones periapicales (36.7%) que en dientes sin lesiones (13.3%) de acuerdo con Ashraf y cols.(40), así como Siqueira y cols.(34) establecieron que es el hongo más prevalentemente encontrado en conductos previamente tratados, por otro lado Kumar y cols.(41), reportaron su presencia en un 53.3% en dientes que necesitaban retratamiento endodóntico (34,40,41), en los estudios de Zargar y cols.(16) fue identificada en un 40% en dientes con lesiones periapicales menores de 5 mm en comparación con dientes con lesiones de mayor tamaño en un 26.7%. A su vez su prevalencia fue mayor en dientes asintomáticos (34.6%) que en dientes sintomáticos (25%)(16). Las revisiones de

Mergoni y cols.(42) y Persoon y cols.(39) informaron que es el aislado más común del microbioma endodóntico.

1.4 Formas de Organización Bacteriana (Fig. 5)

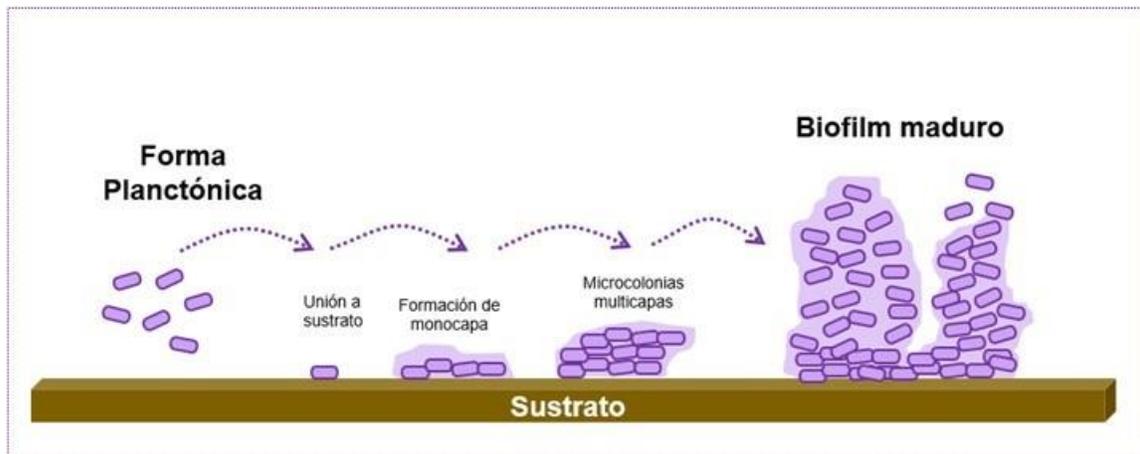


Fig. 5 Formas de organización Bacteriana: forma planctónica pasando por diferentes etapas hasta llegar a Biofilm/ Ortega-Peña, S., & Hernández-Zamora, E. (2018). Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. Boletín médico del Hospital Infantil de México, 75(2), 79–88(43).

Una infección endodóntica aguda es usualmente causada por comunidades bacterianas con gran virulencia, usualmente relacionadas a células bacterianas en estado planctónico, con alto contenido de células, y habilidad de invasión de tejidos, contraatacadas por la resistencia del huésped. Las células planctónicas son a menudo observadas en el lumen del conducto principal y pueden haber sido desunidas y liberadas del biofilm, o pueden haber sido arrastradas por la saliva. El comportamiento de las células en estado planctónico es fundamentalmente diferente al de las comunidades en biofilm. Muchas enzimas y toxinas son suprimidas cuando las bacterias se encuentran organizadas en biofilm, pero su producción puede ser reiniciada y amplificada cuando las células individuales (microorganismo en forma planctónica) son liberadas de él. La infección crónica se asocia con baja virulencia de la comunidad bacteriana, lo que representa una fuente persistente de agresión a los tejidos. Su persistencia ocurre porque estas comunidades están organizadas en biofilm siendo inaccesibles a las defensas del huésped y a los procedimientos de desinfección. La yuxtaposición de las comunidades bacterianas a los tejidos no acostumbrados y adaptados a su presencia desencadena una respuesta inflamatoria

e inmunológica protectora y a su vez destructiva. En periodontitis apical crónica, las bacterias en el conducto radicular necrótico causan una infección por medio de comunidades protegidas en las paredes del conducto causantes de una inflamación persistente por el contacto cercano con el ligamento periodontal en apical(3,4).

1.5 BIOFILM

El biofilm es un modelo de crecimiento bacteriano donde las células sésiles interactúan para formar comunidades dinámicas unidas a un sustrato sólido y se localizan en una matriz de sustancia polimérica extracelular (EPS), proporcionan a los patógenos un hábitat más favorable para vivir y una diversidad metabólica más eficiente. Estas comunidades funcionales coordinadas ofrecen a las bacterias protección frente a otros microorganismos competitivos, agentes antimicrobianos y defensas del huésped, aumentando así su patogenicidad(4,16). Los microorganismos que viven en la misma comunidad deben tener las siguientes características: autopoiesis (tener la habilidad de autoorganizarse), homeostasis (resistir alteraciones del ambiente en el que habitan), sinergismo (ser más efectivo en grupos que de forma aislada) y tener la habilidad de responder a cambios como una unidad(4).

Es difícil determinar si una infección es causada por biofilm, Parsek y cols.(44), propusieron algunos criterios para definir las infecciones causadas por biofilm: las bacterias tienen que estar unidas o asociadas a una superficie, la examinación de los tejidos infectados tiene que mostrar algunas micro colonias rodeadas por matriz extracelular, debe estar limitada a una zona específica y debe ser difícil o imposible erradicarla con antibióticos. Su localización puede ser intra o extra-radicular (Fig. 6 y 7). La mayoría de las veces en 77% de los casos es usualmente intrarradicular, mientras que solo el 6% representa la porción extrarradicular. Además, se ha descrito que la presencia de biofilm intrarradicular suele asociarse a lesiones periapicales de larga evolución(16,44).

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

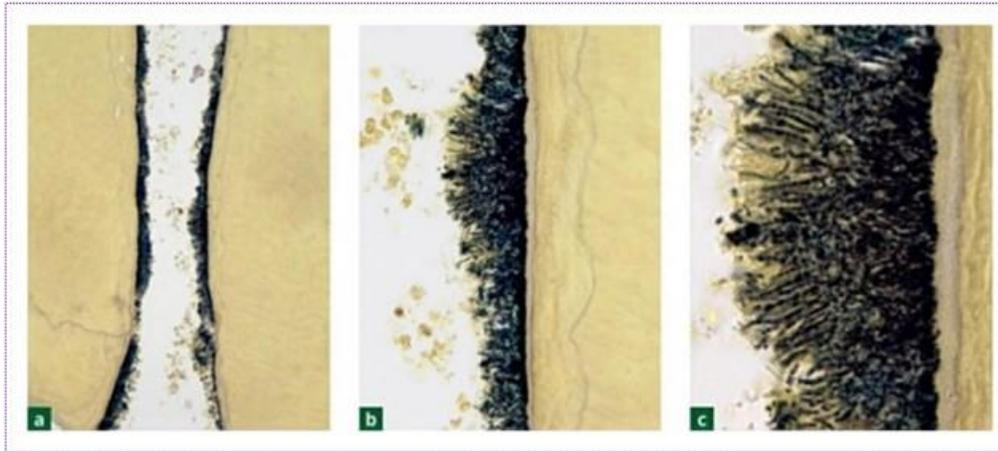


Fig. 6 (A) Biofilm intrarradicular unido a las paredes del conducto radicular. Esta es la principal forma en la cual las bacterias son encontradas colonizando el conducto radicular. Mayor magnificación en imagen (B) y (C)/ Siqueira Jr. José F, Rocas Isabela N. Treatment of Endodontic Infections. 2ª Ed. Alemania: Quintessence Publishing; 2022(2).

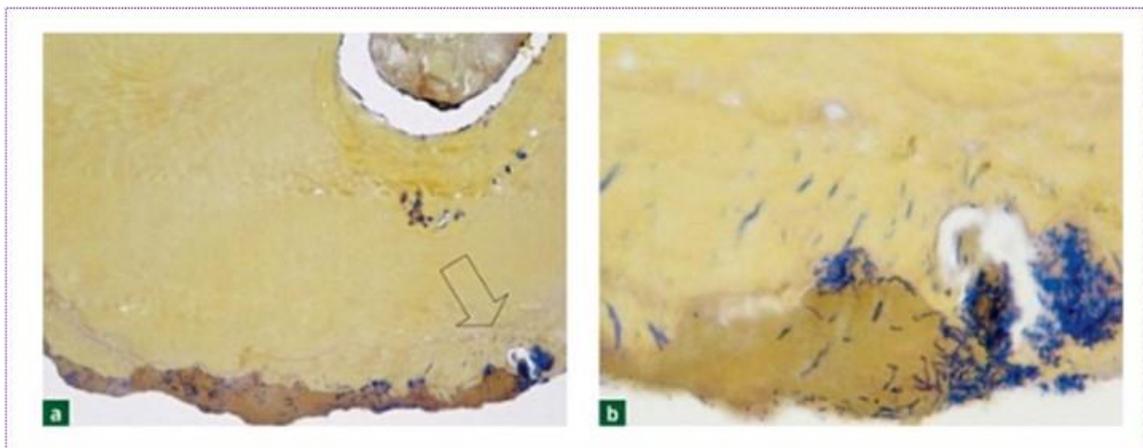


Fig. 7 (A) Biofilm bacteriano extrarradicular de origen Endodóntico. (B) Mayor magnificación de la zona marcada con una flecha/ Siqueira Jr. José F, Rocas Isabela N. Treatment of Endodontic Infections. 2ª Ed. Alemania: Quintessence Publishing; 2022(2).

Los microorganismos asociados en biofilm son generalmente menos agresivos en causar daño a los tejidos de forma inmediata, pero son potencialmente dañinos porque pueden estimular inflamación persistente asociada con daño a los tejidos colaterales, también son un foco potencial para exacerbaciones agudas mediante la liberación de células planctónicas suficientes para que inicien este tipo de infección. El daño a los tejidos y la inflamación resultante son generalmente proporcionales a la densidad celular y la composición de las especies en el biofilm(45).

Un conducto radicular infectado alberga una comunidad microbiana endodóntica compuesta de muchas micro colonias. Las poblaciones individuales a veces consisten en una sola especie, pero más frecuentemente están compuestas de diferentes especies bacterianas que colectivamente dan lugar a una comunidad mixta. Cada población tiene un rol funcional (nicho) que contribuye a la comunidad en general y ayuda a mantener el balance ecológico del ecosistema(19,27). Hay una reciente tendencia a moverse del paradigma de que un solo patógeno causa una infección endógena humana hacia una visión más holística de la comunidad patológica como unidad subyacente de patogenicidad, las actividades colaborativas de esta comunidad de biofilm dan como resultado la periodontitis apical(4).

Los perfiles de la comunidad son esencialmente determinados por la riqueza (número de diferentes especies) y abundancia (proporción de cada especie) de las especies. Los análisis de identificación bacteriana de la microbiota endodóntica han revelado algunos descubrimientos interesantes, como:

- Diferentes tipos de infecciones endodónticas, incluyendo infecciones persistentes o secundarias asociadas a dientes tratados endodónticamente están compuestas por comunidades bacterianas mixtas.
- Se han encontrado bacterias no cultivables intraconducto.
- Comunidades endodónticas bacterianas asociadas con la misma enfermedad clínica exhiben gran variabilidad interindividual.
- Comunidades bacterianas parecen seguir un patrón específico de acuerdo con la condición clínica, la severidad de la enfermedad o la respuesta al tratamiento.
- La variabilidad interindividual es más pronunciada en individuos de diferentes localizaciones geográficas.
- La composición de la microbiota en la porción apical del conducto radicular es significativamente diferente que en la porción coronal y media del conducto(4,12).

1.5.1 Formación del Biofilm

La mayoría de los microorganismos en la naturaleza crecen y funcionan como miembros de comunidades integradas metabólicamente o biofilms. En la microbiología médica la habilidad de formar biofilm ha sido considerada como factor de virulencia(43). Dependiendo del tiempo que se han acumulado y permanecido sin disturbios, los biofilms dentales pueden alcanzar de 300 a más capas de células en grosor(46). La formación de biofilm en cualquier superficie implica principalmente tres etapas. La primera etapa implica unión de las células a una superficie, seguida del ensamblaje de las células para formar microcolonias y finalmente la diferenciación del biofilm en una estructura madura (Fig. 7).

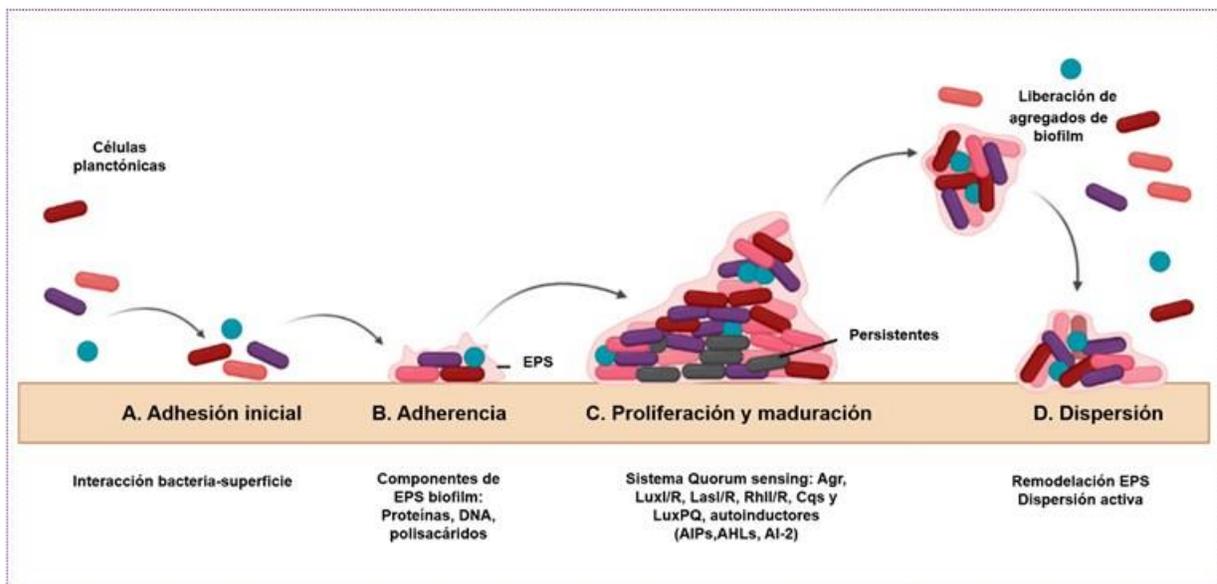


Fig. 8 Formación del Biofilm/ Shrestha, L., Fan, H. M., Tao, H. R., & Huang, J. D. (2022). Recent Strategies to Combat Biofilms Using Antimicrobial Agents and Therapeutic Approaches. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 11(3), 292.(47)

Después de su desarrollo completo, su dispersión tiene lugar mediante procesos tanto mecánicos como activos. Cuando las bacterias comienzan a secretar la matriz polimérica extracelular (EPS), en la segunda etapa se convierte en un proceso irreversible. La secreción de EPS es continua hasta la tercera etapa de formación, lo que garantiza la unión segura de las bacterias a la superficie(48). La matriz EPS confiere características únicas, funciona como andamio para las comunidades bacterianas, juega un rol esencial en la fisiología, producción y protección del biofilm.

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

Esta matriz puede considerarse como biopolímeros hidratados, principalmente compuestos por exopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y lipooligosacáridos. Su principal función incluye:

- Adhesión a las superficies (sirviendo como pegamento biológico).
- Estabilidad mecánica.
- Acumulación de enzimas extracelulares que pueden tener actividades importantes para la comunidad (adquisición de nutrientes y degradación cooperativa de macromoléculas complejas).
- Mantenimiento de las células en el biofilm en proximidad cercana, favoreciendo las interacciones.
- Fuente de nutrientes en periodos de privación de ellos.
- Retención de agua para mantener el microambiente hidratado.
- Protección contra fagocitos y moléculas de defensa del huésped.
- Protección contra agentes antimicrobianos usados durante el tratamiento(49).

La estructura del biofilm difiere significativamente de acuerdo con las características físicas, químicas y biológicas del ambiente. La forma de las micro colonias dentro de los biofilms es modelada por fuerzas relacionadas al flujo del fluido sobre los mismos. Con una fuerza modeladora baja, las colonias son morfológicamente como torres o en forma de hongo, con grupos celulares circulares separados por vacíos; mientras que, con altas fuerzas de modelado, las colonias son elongadas en la dirección del flujo y capaces de realizar oscilación rápida, teniendo así la ventaja del afluente, lo que puede incrementar el transporte de solutos a través del biofilm(50). Las bacterias forman poblaciones que no son aleatoriamente distribuidas, pero están funcional y espacialmente organizadas a través de una comunidad mixta, las poblaciones son posicionadas estratégicamente para una interacción metabólica óptima, y que la arquitectura resultante favorezca el rol ecológico de la comunidad. Las características mostradas por un biofilm mixto son principalmente dictadas por interacciones entre las poblaciones, lo cual crea funciones fisiológicas nuevas.

El estilo de vida en comunidad ofrece las siguientes ventajas:

- Amplía el rango de hábitat de crecimiento de una microbiota más diversa.
- Aumenta la diversidad metabólica y eficiencia debido a redes alimentarias.
- Protege de microorganismos competentes, defensa del huésped, estrés ambiental y aumentan su resistencia contra los antibióticos convencionales alrededor de 1000 veces.
- Facilita los intercambios genéticos, lo cual puede involucrar codificación de genes para, resistencia antibiótica y factores de virulencia.
- Aumenta la patogenicidad(4,46).

El comportamiento de la comunidad bacteriana y el resultado de las interacciones huésped-comunidad bacteriana depende de cuales especies componen la comunidad y como las innumerables asociaciones que ocurren dentro de ella afectan y modulan la virulencia de sus miembros. El desarrollo de periodontitis apical requiere de la acción concentrada de bacterias en comunidad. Los factores de virulencia involucrados en la patogénesis de la periodontitis representan la suma de sustancias producidas por la comunidad endodóntica bacteriana. Los efectos biológicos de las bacterias endodónticas son el resultado de la patogenicidad colectiva de la comunidad, lo cual depende en la densidad de la población en general y la composición de las especies, así como las interacciones sinérgicas entre ellas. En comunidades mixtas de amplio espectro las relaciones con las especies de sus componentes pueden ir desde ningún efecto o reducida patogenicidad a aditiva o efectos de patogenicidad sinergista (3,4,50).

1.6 Estrategias para combatir el Biofilm

La formación de biofilm contribuye al aumento de la patogenicidad bacteriana y resistencia a los medicamentos, por lo que el tratamiento debe seleccionarse cuidadosamente con base en la sensibilidad, así como en la capacidad de penetrar a través de la matriz de exopolisacáridos. La combinación de diferentes agentes puede ser más favorable que el empleo de uno solo, ya que permite combatir a los microorganismos en sus diferentes etapas del crecimiento(46,48).

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

Existen dos estrategias básicas empleadas para combatir su formación:

- Inhibición: para evitar que se formen biopelículas.
- Dispersión: para eliminar biopelículas ya formadas(48).

Los agentes antibiofilm son diferentes compuestos que pueden inhibir o erradicar su formación, Plakunov y cols.(51) clasifica a los agentes en cuatro categorías en función de sus acciones en diversas etapas de formación (Tabla 2 y Fig.8):

Tabla 2 Clases de agentes antibiofilm y sus funciones/ Plakunov, V.K.; Zhurina, M.V.; Gannesen, A.V.; Mart'yanov, S.V.; Nikolaev, Y.A. Antibiofilm agents: Therminological ambiguity and strategy for search. Microbiology 2019, 88, 747–750(51).

Clases de agentes antibiofilm y sus funciones	
Agentes antibiofilm	Funciones
Clase I	Penetra la matriz de EPS y disminuye el crecimiento celular.
Clase II	Interfiere con la adherencia de la bacteria y la formación del fenotipo del biofilm.
Clase III	Controla tanto el crecimiento de bacterias con el fenotipo del biofilm así como la síntesis de EPS.
Clase IV	Dispersa el biofilm maduro.

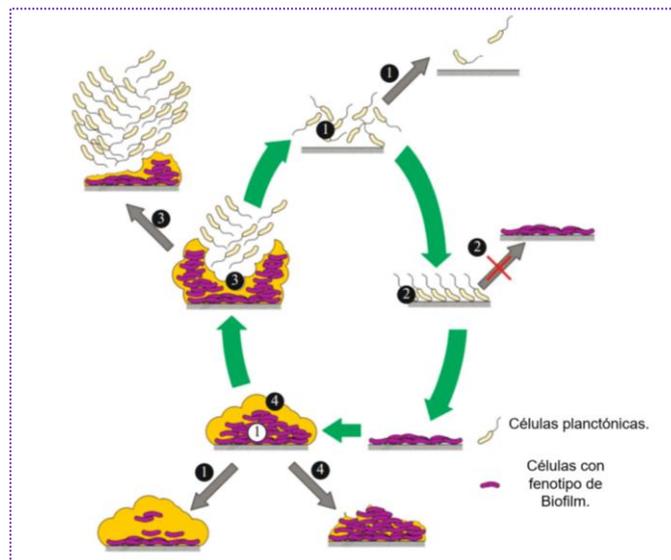


Fig. 9 Representación esquemática de la acción de los agentes en las diferentes etapas de formación del biofilm: 1. Penetra la matriz de EPS y disminuye crecimiento celular. 2. Interfiere con adherencia de la bacteria. 3. Controla el crecimiento de la bacteria y el fenotipo del biofilm. 4. Dispersa el biofilm maduro/ Plakunov, V.K.; Zhurina, M.V.; Gannesen, A.V.; Mart'yanov, S.V.; Nikolaev, Y.A. Antibiofilm agents: Therminological ambiguity and strategy for search. Microbiology 2019, 88, 747–750(49).

La inhibición del biofilm es principalmente lograda por métodos físicos, químicos, biológicos y sinérgicos. Los métodos físicos incluyen ionización, radiación UV, tratamiento ultrasónico, terapia sónica, e instrumentación mecanizada, su mecanismo de acción es a través de energía química y mecánica, incluyendo presión, vibración, estrés, ondas de choque y agitación(52). Los métodos químicos son inestables, no juegan un rol en condiciones severas, por lo que no es el método más utilizado. Los métodos biológicos tienen mayor eficiencia de inhibición, son un nuevo método que incluye la aplicación de bacteriófagos, bacteriocinas y enzimas, este método surge debido a la resistencia del biofilm a los antibióticos convencionales(52,53).

Dentro de estos últimos se encuentra el uso de bacterias benéficas o probióticos contra bacterias patógenas que actúan sobre el no asentamiento del biofilm de microorganismos patógenos(53).

1.7 Probióticos

La palabra “probiótico” es derivada del griego (προβιοτικό: πρό y βίος) y significa “pro-vida”. La más reciente y aceptada definición “Microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas(al menos 10^6 UFC viables/g), confieren un beneficio en la salud del huésped” fue originalmente aceptada en 2001 en una concentración de científicos que trabajaban en nombre de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, así como la Organización Mundial de la Salud (FAO/WHO), en 2014 la asociación científica internacional para probióticos y prebióticos (ISAPP) la publicó(54,55). La definición implica un número de elementos que debe cumplir, con evidencia clínica y científica que sustente sus beneficios a la salud en ciertas poblaciones a ciertas dosis. Estos microorganismos forman parte de nuestra flora intestinal, pero también pueden encontrarse en otros ambientes ecológicos. Sus propiedades están relacionadas con la cepa e incluso dependen del tejido donde actúan, por lo que su efecto no es universal para todas las especies bacterianas ni para todos los tejidos humanos(55).

Existen registros que demuestran el consumo de alimentos con microorganismos vivos en leches fermentadas desde la antigüedad, Metchnikoff fue el primer científico en

proponer su uso y se ha conservado este consumo hasta nuestros días, pueden utilizarse como complementos alimenticios o como medicamentos en forma de pastillas, suspensiones o polvo que contienen una sola cepa o una combinación de varias. Generalmente se acepta que la dosis de microorganismos probióticos debe ser de 100 millones a 10 mil millones de microorganismos para que sea eficaz(56).

Su uso ha sido aplicado para modular el microbioma de una forma benéfica contra infecciones, como alternativa a los antibióticos, permitiendo reducir la resistencia antimicrobiana debido al mal uso de los antibióticos(57), basándose en que pueden amplificar los efectos fisiológicos beneficiosos de la microflora intestinal normal. La efectividad de los probióticos depende de la especie, dosis, enfermedad, y la duración de la administración depende de la indicación clínica(58).

Las cepas probióticas tienen que ser sometidas a estudios sobre sus características, incluido el perfil bioquímico, la adherencia y capacidad de invasión a las células intestinales (55), estudios farmacocinéticos (vida media, permeabilidad intestinal, correlación de la dosis obtenida y persistencia en heces) (59), así como estudios sobre la tolerancia de la cepa probiótica por parte del huésped y su aporte sobre la microflora bacteriana(60). Todas estas pruebas permiten caracterizar por parte de la Food and Drug Administration (FDA) (EE.UU.) una cepa probiótica bajo el acrónimo de “GRAS” (Generally Recognized As Safe), es decir, un complemento alimenticio considerado seguro para su consumo(61).

En general las características que un probiótico efectivo debe poseer son las siguientes:

1. Debe ser capaz de ser preparado como producto viable a escala industrial.
2. Permanecer estable y viable por periodos prolongados bajo almacenamiento y en condiciones de campo.
3. Tener la habilidad de sobrevivir (no necesariamente en crecimiento) en el intestino.
4. Producir efectos benéficos en el huésped.
5. Supresión de reacciones que resultarían en la generación de metabolitos tóxicos o carcinogénicos.

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

6. Estimulación de reacciones enzimáticas involucradas en la detoxificación de sustancias potencialmente tóxicas, ya sea ingeridas o formadas endógenamente.
7. Estimulación de enzimas mamíferas involucradas en la digestión de nutrientes complejos, o de aquellas donde las enzimas están ausentes.
8. Síntesis de vitaminas y otros nutrientes esenciales no provistos en cantidad suficiente en la dieta(62).

1.7.1 Mecanismo de acción

Los procesos detrás de los efectos benéficos de los probióticos no se conocen completamente, ya que son multifactoriales y se diferencian según la especie. Algunos de estos mecanismos se relacionan con sus efectos para antagonizar varios microorganismos dañinos a través de la secreción de sustancias antimicrobianas, la competencia por la adhesión a la mucosa y el epitelio, el fortalecimiento de la barrera epitelial intestinal, así como la modulación del sistema inmunológico(Fig.10).

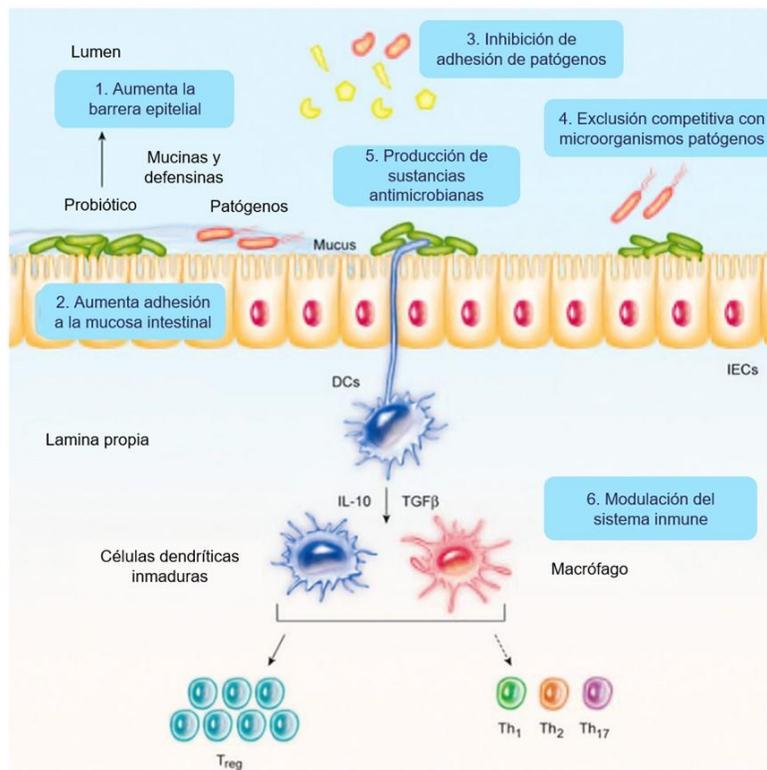


Fig. 10 Mecanismo de acción de probióticos/Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., & Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of nutrition & metabolism*, 61(2), 160–174(63).

Modulación del Sistema Inmune

Los probióticos son capaces de estimular mecanismos de defensa específicos e inespecíficos en el cuerpo humano, a través de la inmunoestimulación y la inmunorregulación lo que amplificará la respuesta inmune para combatir enfermedades infecciosas o patologías intrínsecas(64,65). Sus efectos se deben principalmente a el aumento de anticuerpos naturales IgM e IgG(66) a la inducción de la liberación de citocinas, incluidas las interleucinas, el factor de crecimiento transformante (TGF), los factores de necrosis tumoral (TNF), los interferones (INF) y las quimiocinas liberadas por las células inmunitarias, que modulan beneficiosamente la respuesta inmune del huésped y suprimen la expresión de citocinas proinflamatorias y la inflamación posterior(67). Los probióticos producen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), mientras que células inmunitarias o epiteliales expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs)(68),ambos interactúan, e inician una respuesta inmunitaria principal y una señalización celular que aumentara la capacidad de la fagocitosis(63).

Exclusión competitiva entre bacterias patógenas y probióticos

Producida por competencia de nutrientes limitados, por modulación del pH (mantienen un pH ácido)(69), por una condición en la que una bacteria tiene mayor potencial para adherirse al epitelio a través de un receptor, que otras especies(63)y por la producción de péptidos antimicrobianos (AMP) frente a los competidores(70). La interacción entre las moléculas distribuidas en el epitelio intestinal y la superficie de las células bacterianas media la adhesión y colonización de las bacterias. Los probióticos producen moléculas de superficie de adhesión (enolasas, gliceraldehído-3-fosfato y piruvato deshidrogenasa) que se adhieren a la matriz extracelular del huésped(71,72). Estas moléculas de superficie los ayudan a combatir o prevenir la adhesión y colonización de bacterias patógenas(73,74). El pretratamiento con bacterias benéficas impide la unión de las patógenas a los sitios receptores de la célula huésped mediante una postura de impedimento estérico y reduce la colonización de microbios(75). Esta adhesión aumenta la oportunidad de interacción con el huésped, lo que a su vez

favorece los efectos inmunoestimuladores de las moléculas de superficie y sus metabolitos(55,76).

Mantenimiento de la integridad de la mucosa y función de barrera intestinal

La mucosa es una barrera física fundamental para prevenir la entrada de toxinas, bacterias y compuestos extraños no deseados, su integridad y función completa son muy importantes. Los probióticos mejoran la función de la barrera intestinal al aumentar la expresión de proteínas de unión estrecha y la expresión de mucina(77,78). Anderson y cols.(79) reportaron que las bacterias benéficas ácido lácticas pueden mejorar el daño de la barrera epitelial intestinal inducido por la infección patógena.

Regulación de movilidad intestinal

La movilidad es modulada por el sistema nervioso entérico en la pared intestinal. Existe una comunicación recíproca entre este sistema y la flora bacteriana en el intestino(80).

Producción de agentes antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos, los ácidos orgánicos y las bacteriocinas producidas por los probióticos estimulan la producción de mucinas intestinales que a su vez evitarán la implantación de patógenos(81), por su parte las bacteriocinas tienen un bajo peso molecular, se encargan de formar poros en las membranas de las células diana provocando su muerte(82).

Aplicación de Probióticos en la salud Humana

Los probióticos se emplean extensamente para tratar infecciones bacterianas, virales y parasitarias, así como trastornos no infecciosos como trastornos mentales, cáncer, alergias y trastornos metabólicos(80). En la actualidad forman parte de la nutrición humana consumidos a través de productos animales fermentados, frutas fermentadas, sus jugos, o en forma tópica o por contacto(62). (Fig.11)

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

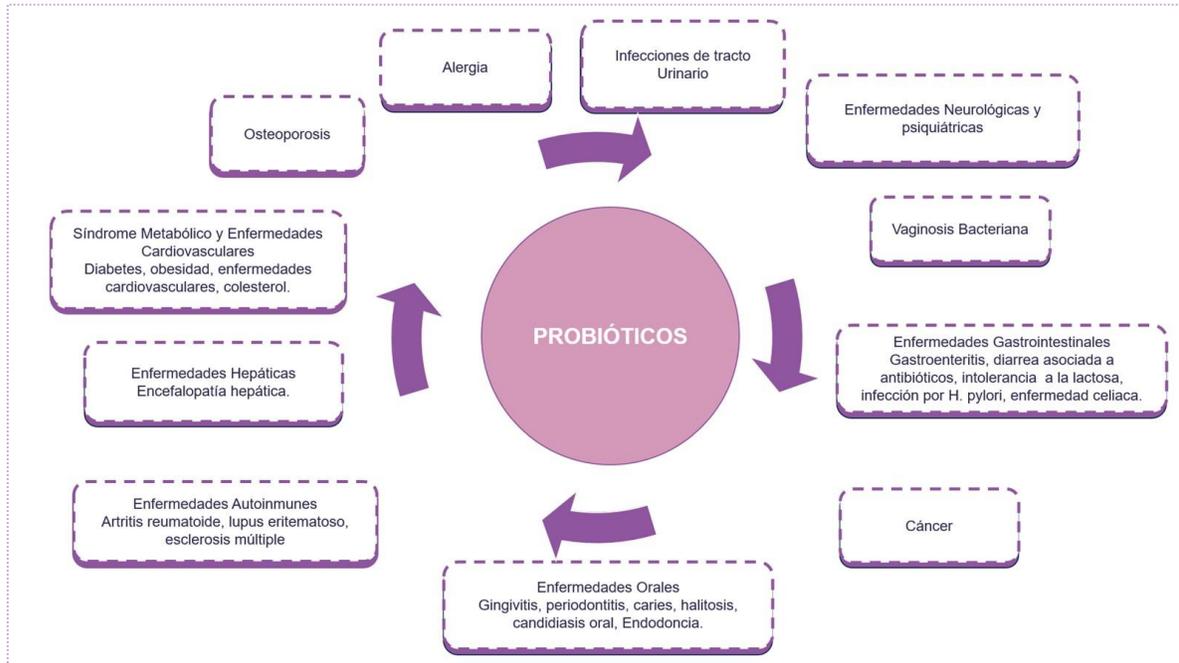


Fig. 11 Aplicaciones de los probióticos en la salud humana/ Stavropoulou, E., & Bezirtzoglou, E. (2020). Probiotics in Medicine: A Long Debate. *Frontiers in immunology*, 11, 2192.(56)

En el sistema gastrointestinal su eficacia ha sido ampliamente observada para diarrea infecciosa aguda, diarrea viral aguda, diarrea asociada a terapia antibiótica, diarrea asociada con infección por *C. difficile* colitis ulcerativa, síndrome de colon irritable, dolor abdominal funcional, constipación crónica, enterocolitis necrotizante, encefalopatía hepática, enfermedad celíaca(83), en el sistema nervioso-intestinal se sugiere su uso para reducir síntomas de depresión(84), son capaces de degradar y unir compuestos cancerígenos que se encuentran en una dieta o producidos por patógenos. Se han empleado los probióticos también para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, osteoporosis, enfermedades autoinmunes y respiratorias(56).

En la cavidad oral se han realizado estudios con probióticos capaces de modular la microbiota y reducir el riesgo de gingivitis y periodontitis(85) también se ha observado su efecto benéfico en caries dental, ya que pueden reducir los niveles de *Streptococcus mutans*(86). Hatakka y cols.(87), emplearon *L. rhamnosus* GG en tratamiento de candidiasis oral en adultos mayores notaron una reducción de la prevalencia de *C. albicans* después de la terapia con probióticos.

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

En Endodoncia a algunos autores han reportado su uso, Cosme-Silva y cols.(88), realizaron un estudio en ratas para observar si la suplementación con probióticos orales (*Lactobacillus rhamnosus* y *L. acidophilus*) podía reducir la formación de lesiones periapicales, concluyeron que la terapia con probióticos por 30 días reduce significativamente el volumen de resorción ósea. Kumar y cols.(89), realizaron una revisión de la literatura, encontrando resultados prometedores sobre el rol benéfico de los probióticos en controlar la proliferación del proceso patogénico de infecciones endodónticas, por su parte Bohora y cols.(2), sugirieron que los probióticos son efectivos para prevenir el crecimiento de patógenos endodónticos *in vivo*, mientras que Charan y cols.(90), concluyeron que la terapia con probióticos es un tratamiento antibacterial prometedor y que es necesaria mayor información sobre este tipo de terapia.

1.7.2 *Bacillus*

Género de bacterias Grampositivas, en forma de bastoncillo, pueden ser aerobias o anaerobias facultativas, son formadoras de esporas, lo que le proporciona estabilidad a medios ácidos y temperatura en rango amplio, posee ventajas en la exclusión de patógenos, es antioxidante, antimicrobiano e inmunomodulador(91,92). Las cepas de *Bacillus* mayormente examinadas por su actividad probiótica en humanos incluyen *B. subtilis*, *B. clausii*, *B. licheniformis*, *B. polyfermenticus* y *B. coagulans* (Tabla 2)(92).

Tabla 3. Cepas de *Bacillus* mayormente examinadas como probióticos./ Sella, S. R. B. R., Vandenberghe, L. P. S., & Soccol, C. R. (2014). Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. *Microbiological Research*, 169(12), 931–939(93).

Nombre de <i>Bacillus</i> sp.	Beneficios
<i>B. subtilis</i>	Actividad antimicrobiana, produce antibióticos, tiene actividad antiviral.
<i>B. licheniformis</i>	Propiedades antidiabéticas.
<i>B. Polyfermenticus</i>	Actividad antioxidante y reduce el colesterol, produce bacteriocinas, tiene efecto anticancerígeno.
<i>B. Coagulans</i>	Produce coagulina (bacteriocina), reduce la concentración de lípidos en sangre, terapia coadyuvante para artritis reumatoide.
<i>B. clausii</i>	Propiedades inmunomoduladoras y antimicrobianas, efecto antiinflamatorio contra efectos secundarios de antibióticos, aumenta la producción de interferón, de proliferación de célula T mitogénica y modula la respuesta inmune.

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

Las propiedades benéficas del género *Bacillus sp.*(Fig.12) son su capacidad antimicrobiana, antioxidante, su actividad inmunomoduladora a través de la síntesis de péptidos antimicrobianos y su capacidad de restricción del biofilm bacteriano. Los productos probióticos a base de esporas son altamente estables y resistentes, son capaces de soportar los rayos UV, el calor extremo, la exposición al peróxido de hidrógeno, la lisozima y pueden crecer, proliferar y re-esporular en condiciones hostiles. También mantienen la microbiota sintetizando diferentes antimicrobianos y enzimas (principalmente exoenzimas), las cuales suprimen los microorganismos patógenos en el huésped. Se involucran en la prohibición competitiva y mejoran las reacciones metabólicas en el cuerpo mediante la absorción de nutrientes(92,94–96).

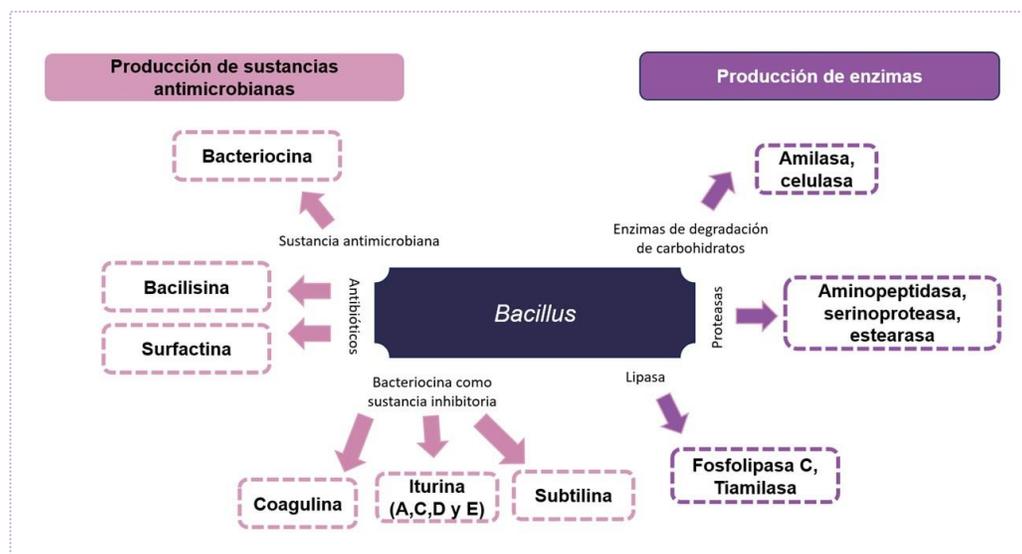


Fig. 12 Propiedades benéficas de *Bacillus sp.*/ Sella, S. R. B. R., Vandenberghe, L. P. S., & Socol, C. R. (2014). Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. *Microbiological Research*, 169(12), 931–939(92).

Ciclo de Vida

Consiste en tres diferentes procesos fisiológicos: crecimiento vegetativo, esporulación y germinación, la transición de uno a otro depende de la disponibilidad de nutrientes. Diversas vías de señalización transmiten información nutricional y de crecimiento a la maquinaria del ciclo celular para permitir que las células adapten el proceso del ciclo celular al entorno(92).

1. Crecimiento Vegetativo

Representado por crecimiento celular por fisión simétrica binaria, sucede cuando hay nutrientes disponibles. La replicación cromosómica está íntimamente unida al ciclo de división celular de células vegetativas. La separación total de las células hermanas por escisión de la pared celular en las especies de *Bacillus* puede no ocurrir en algunas circunstancias, y las células pueden permanecer unidas a través de múltiples rondas de fisión binaria, formando largas cadenas(97).

2. Esporulación

La privación de nutrientes, la composición alta de minerales, pH neutral, la temperatura, y la alta densidad celular pueden desencadenar la diferenciación de células vegetativas en endoesporas. El aumento la masa celular asociada con la acumulación de péptidos secretados es detectada por receptores de superficie celular que promueven la activación secuencial del regulador maestro (SpoA). Esta activación se denomina fosforescencia e implica la transferencia de grupos fosfato del ATP a través de histidina quinasa y dos proteínas intermedias (Spo0F y Spo0B), a un factor de transcripción (Spo0A). Spo0A-P controla la expresión de una multitud de genes, desencadenando una cadena de eventos que tarda varias horas en completarse y culmina con la liberación de una espora madura del compartimento de la célula madre.

Este proceso consta de siete etapas:

Etapa I: El material nuclear se dispone axialmente en filamentos.

Etapa II: Finaliza la segregación del ADN al mismo tiempo que la invaginación de la membrana plasmática en una posición asimétrica, cerca de un polo de la célula, formando un tabique.

Etapa III: El tabique comienza a curvarse, la espora inmadura es rodeada por una doble membrana de la célula madre en un proceso de absorción, muy parecido a la fagocitosis, la espora más pequeña queda completamente contenida dentro de la célula madre.

Etapa IV: La célula madre media el desarrollo de la pre-espora en espora. Las membranas proteínicas interna y externa de la espora se ensamblan y se sintetiza la corteza de la espora, que es una capa gruesa de peptidoglicanos contenidos entre las membranas.

Etapa V: Es sintetizada la cubierta de la espora, la cual consta de 80 proteínas depositadas por la célula madre y se organiza en capas interna y externa.

Etapa VI: Ocorre la maduración de la espora, se vuelven resistentes al calor y a los solventes orgánicos.

Etapa VII: Las enzimas líticas rompen la célula madre y liberan la espora madura(92,98).

3. Germinación

Las esporas pueden permanecer inactivas por periodos prolongados y poseer una resistencia remarcada a los daños ambientales, como calor, radiación, químicos tóxicos y pH extremo. Bajo condiciones ambientales favorables, la espora rompe su inactividad y reinicia su crecimiento. Este proceso de germinación ocurre en tres fases:

Etapa I: Activación, definido como el proceso de inicio o desencadenante en respuesta a la reposición nutricional que ocurre cuando las moléculas en germinación son detectadas por los receptores de germinación (GR) ubicados en la membrana interna de la espora. La presión hidrostática alta de 200 a 400 MPa también desencadena la germinación a través de los GR. La espora en germinación eleva el pH del núcleo de la espora de 6.5 a 7.7. Las enzimas líticas de la corteza se activan y la corteza protectora de peptidoglicano de la espora se degrada, esta activación es un proceso reversible. Etapa II: el DPA (ácido piridin-2,6-dicarboxílico) se degrada y se libera, seguido de la rehidratación del núcleo de la espora, lo que permite el inicio de la movilidad de proteínas y la reactivación de procesos bioquímicos durante el crecimiento(99). Etapa III: La hidrólisis de la capa de esporas permite la emergencia de la célula vegetativa incipiente(92,97).

2. JUSTIFICACIÓN

Dentro de los microorganismos con mayor prevalencia reportada en infecciones persistentes se encuentran *Enterococcus faecalis* con un rango de hasta 80% y *Candida albicans* en una prevalencia de hasta el 40%, su subsistencia se debe principalmente a sus variables factores de virulencia que les confieren la capacidad de adaptarse, organizarse y reproducirse aún en condiciones no favorables.

En la búsqueda de alternativas accesibles, efectivas y menos agresivas para la eliminación de los microorganismos resistentes con capacidad de persistir en el sistema de conductos radiculares, se ha propuesto el empleo de terapias biológicas como el uso de probióticos. Su uso se ha sugerido por sus capacidades de competencia con otros microorganismos, por su agregación o coagregación a biofilm de bacterias patógenas, y por su facultad para producir moléculas capaces de inhibir el crecimiento de patógenos. Sin embargo, aún es requerida mayor evidencia que compruebe su uso y eficacia contra microorganismos de alta virulencia como lo son *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*.

2.1 Pregunta de Investigación

¿Qué acción presenta *Bacillus clausii* en forma vegetativa y esporulada en un Biofilm de *Enterococcus faecalis* ?

¿Qué acción presenta *Bacillus clausii* en forma vegetativa y esporulada en un Biofilm de *Candida albicans*?

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en forma vegetativa y esporulada en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

3.2 Objetivos Específicos

- Estandarizar un protocolo de germinación a partir de esporas de *Bacillus clausii* (*Enterogermina*®).
- Formar biofilm de *E. faecalis* con *B. clausii* (en forma esporulada y vegetativa) por flujo laminar por 6 y 20 días.
- Formar biofilm de *C. albicans* con *B. clausii* (en forma esporulada y vegetativa) por flujo laminar por 6 y 20 días.
- Observar al MEB .

4. HIPÓTESIS

Hi: *Bacillus clausii* en forma vegetativa y esporulada tiene un efecto inhibitor del biofilm de *E. faecalis* a 6 y 20 días.

Hi: *Bacillus clausii* en forma vegetativa y esporulada tiene un efecto inhibitor del biofilm de *C. albicans* a 6 y 20 días.

Ho: *Bacillus clausii* en forma vegetativa y esporulada no tiene un efecto inhibitor del biofilm de *E. faecalis* a 6 y 20 días.

Ho: *Bacillus clausii* en forma vegetativa y esporulada no tiene un efecto inhibitor del biofilm de *C. albicans* a 6 y 20 días.

5.METODOLOGÍA

5.1 Lugar de realización

- Laboratorio de preclínica de la Maestría en Endodoncia, Facultad de Estomatología, UASLP.
- Laboratorio Multidisciplinario de la Maestría en Endodoncia, Facultad de Estomatología, UASLP.
- Doctorado en Ciencias Odontológicas, Facultad de Estomatología, UASLP.

5.2 Diseño de estudio

Experimental *In vitro*.

5.3 Criterios de Selección

5.3.1 Inclusión

- Raíces de dientes uniradiculares.
- Raíces rectas de 10-12 mm de longitud.
- Raíces con diámetro apical de 0.35 mm.

5.3.2 Exclusión

- Raíces con ápice abierto.
- Raíces con fractura.
- Raíces con resorción.
- Raíces calcificadas.
- Raíces con curvaturas.
- Raíces con instrumentos separados.
- Raíces con tratamiento endodóntico.

5.3.3 Eliminación

- Raíces sin formación de Biofilm.
- Contaminación del Biofilm con otros microorganismos.
- Muestras mal procesadas.

5.4 Definición Conceptual y Operacional de las variables

5.4.1 Independientes

Morfología microbiana de *Bacillus clausii*

Clasificación: Categórica nominal.

Definición conceptual: Forma que adquiere un microorganismo formador de esporas dependiendo de las condiciones y ambiente en el que se reproduce.

Definición operacional: Se tomarán esporas de *B. clausii* presentación comercial para su aplicación en muestras. Se germinarán las esporas de *B. clausii* para su aplicación en muestras.

Escala de medición: Observación al MEB del comportamiento

Tiempo

Clasificación: Cuantitativa de razón.

Definición conceptual: Magnitud física con la que se mide la duración o separación de acontecimientos, permite ordenar los sucesos en secuencias.

Definición operacional: Se observarán los efectos de *B. clausii* (forma vegetativa y esporulada) en biofilm de dos especies microbianas a dos tiempos: 6 y 20 días.

Escala de medición: Días.

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

5.4.2 Dependientes

Biofilm disgregado

Clasificación: Categórica ordinal

Definición conceptual: Porción de matriz polimérica extracelular removida junto con células bacterianas y sus productos de la superficie donde se encuentra adherida.

Definición operacional: Mediante el MEB se observará y comparará el grado de cobertura de la pared del conducto por el biofilm de *E. faecalis* y *C. albicans* contra *B. clausii* en espora y bacilo.

Escala de medición: Evaluación semicuantitativa con un sistema de 4 puntuaciones(100,101).

5.5 Análisis Estadístico

Los resultados de la disgregación del Biofilm se analizaron mediante la prueba chi-cuadrado para determinar asociación entre las variables y prueba V de Cramér para establecer el nivel de asociación. Se realizaron en el software SPSS versión 29 (SPSS versión para Windows; SPSS Inc, Chicago, IL), de la marca comercial IBM.

5.6 Consideraciones Éticas

Este proyecto fue realizado en la Maestría de Endodoncia y en el Doctorado de Ciencias Odontológicas de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí siguiendo todos los procedimientos y lineamientos de bioseguridad, con el apoyo y supervisión de los profesores responsables del proyecto.

Con la autorización tanto del comité de Tesis de la maestría, como del Comité de Ética de la Universidad asignado con clave: **CEI-FE-077-022**.

Se realizó siguiendo las normas y protocolos COVID establecidos por la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Es un proyecto in vitro en el que se trabajará con piezas dentales donadas por consultorios particulares, centros de salud, y a la clínica de Cirugía de la Facultad de Estomatología. También se trabajará con microorganismos no patógenos.

Los residuos peligrosos biológico-Infecciosos que se lleguen a generar durante la metodología de este proyecto serán manejados de acuerdo con norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 que establece la clasificación y especificaciones del manejo.

Este proyecto tendrá un grado de riesgo I, de acuerdo con el reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud.

5.5 FASE EXPERIMENTAL

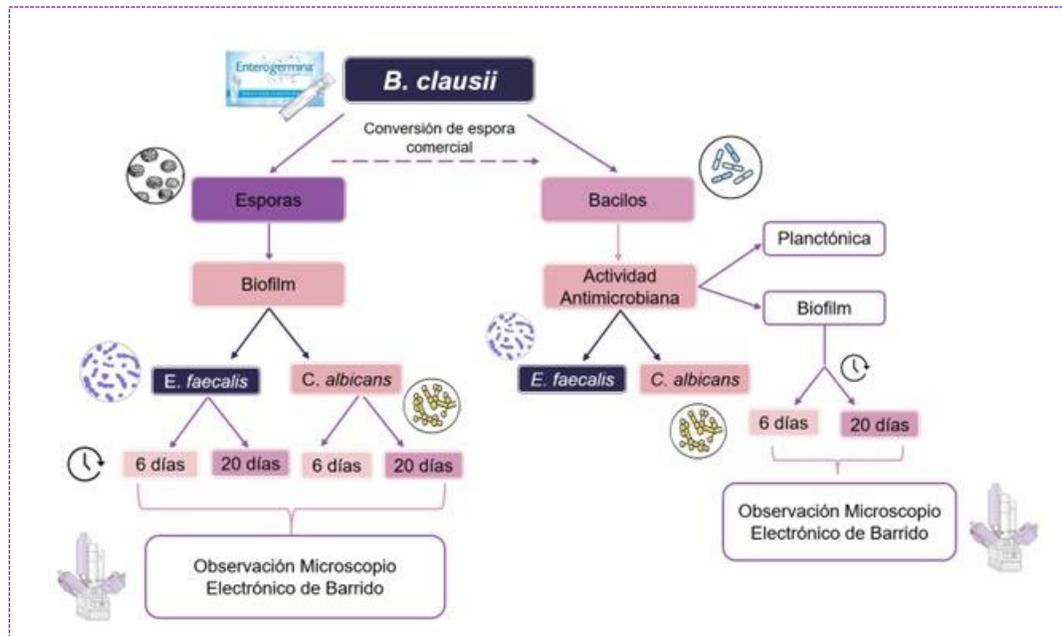


Fig. 13 Secuencia de procedimientos a realizar en el presente estudio.

- **PRIMERA FASE: Estandarización de las muestras**

Esta fase se llevó a cabo en el Laboratorio de Preclínica de la Maestría en Endodoncia, Facultad de Estomatología, UASLP.

Recolección y Selección de las piezas dentales

Se recolectaron 99 raíces unirradiculares humanas extraídas, recaudadas de consultorios dentales particulares y centros de salud de la Ciudad de San Luis Potosí, SLP, Mex. Se seleccionaron 96 raíces de acuerdo con criterios de inclusión, se dividieron mediante muestreo aleatorio simple en Excel.

Todas las raíces fueron lavadas de forma manual con una solución de NaOCl al 0.05%, con ayuda de una cureta se retiraron los restos de tejido blando y duro, posteriormente fueron estandarizadas a una longitud de 10 -12 mm con ayuda de un vernier, se seccionaron con un disco de diamante de 0.15 mm de espesor y pieza de baja velocidad (Anelsam), se patentizaron los conductos con limas K #10 y #15 de 21 mm

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

(Dentsply Maillefer) y se amplió el ápice a 0.35 mm con lima Medium de 21 mm (35/06, WaveOne® Gold/ Dentsply Sirona) (Fig. 14).



Fig. 14 Estandarización de las muestras. Se realizó la recolección de raíces humanas extraídas, posteriormente se decoronaron a la longitud deseada, se patentizaron y se amplió apicalmente a 0.35mm

Limpieza y esterilización

Posterior a la estandarización, se realizó limpieza de acuerdo con la técnica de *Haapasalo y cols., 2011*, se colocaron las raíces en baño ultrasónico Biosonic UC50 (Colténe/Whaledent) por 4 minutos con frecuencia de 30kHz, con las siguientes soluciones: NaOCl 5.25%, EDTA 17%, enjuague final con agua destilada hasta que el agua se observara limpia, las raíces desinfectadas se colocaron en bolsas para autoclave, divididas de acuerdo al grupo de estudio al que pertenecían, después se esterilizaron en autoclave (Kitlab®) a una temperatura de 121°C, con presión de 15 lb, durante 20 minutos y se almacenaron hasta su uso.

Las muestras quedaron agrupadas de la siguiente manera:

Tabla 4. Agrupación de muestras para Grupos de *Enterococcus faecalis* (n=8)

Probiótico		Tiempo			
		A: 6 días	N° de raíces	B: 20 días	N° de raíces
<i>Bacillus clausii</i>	1.Esporas	1A	8	1B	8
		<i>E. faecalis</i> + <i>B. clausii</i> esporas		<i>E. faecalis</i> + <i>B. clausii</i> Bacilos	
	2.Bacilos	2A	8	2B	8
		<i>E. faecalis</i> + <i>B. clausii</i> esporas		<i>E. faecalis</i> + <i>B. clausii</i> bacilos	
Control +	<i>E. faecalis</i> + sol. Salina estéril 6 días	4	<i>E. faecalis</i> + sol. Salina estéril 21 días	4	
Control -	<i>E. faecalis</i> + NaOCl 6 días	4	<i>E. faecalis</i> + NaOCl 21 días	4	

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

Tabla 5. Agrupación de muestras para grupos de *Candida albicans* (n=8)

Probiótico					
		A: 6 días	N° de raíces	B: 20 días	N° de raíces
<i>Bacillus clausii</i>	3.Esporas	3A	8	3B	8
		<i>C. albicans</i> + <i>B. clausii</i> esporas		<i>C. albicans</i> + <i>B. clausii</i> Bacilos	
	4.Bacilos	4A	8	4B	8
		<i>C. albicans</i> + <i>B. clausii</i> esporas		<i>C. albicans</i> + <i>B. clausii</i> bacilos	
	Control +	<i>C. albicans</i> + sol. Salina estéril 6 días	4	<i>C. albicans</i> + sol. Salina estéril 21 días	4
	Control -	<i>C. albicans</i> + NaOCl 6 días	4	<i>C. albicans</i> + NaOCl 21 días	4

- **SEGUNDA FASE: Activación de cepas**

I. *Enterococcus Faecalis*

Enterococcus faecalis se obtuvo del cepario del Laboratorio multidisciplinario de la Maestría en Endodoncia, UASLP, aislado de paciente con diagnóstico de Periodontitis Apical refractaria. Se reactivó el microorganismo, que se encontraba en estado de latencia en agar de soya tripticaseína con aceite mineral, de acuerdo con el siguiente protocolo:

- Reactivación del microorganismo en caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón/ BD Bioxon) e incubación en estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas.
- Siembra en estría en agar BHI (BD/Bioxon) e incubación en estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas.
- Realización de pruebas confirmatorias de pureza del microorganismo mediante observación macroscópica y microscópica por medio de tinción de Gram y API-20 Strep (Fig.15).

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

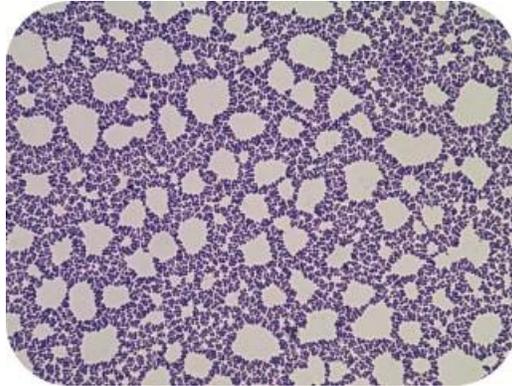


Fig. 15 Confirmación de pureza de microorganismo *E. faecalis*

II. *Candida albicans*

Candida albicans se obtuvo del cepario del Laboratorio multidisciplinario de la Maestría en Endodoncia, UASLP, aislada de paciente con diagnóstico de Periodontitis Apical refractaria. Se reactivó el microorganismo, que se encontraba en estado de latencia en agar Dextrosa Sabouraud con aceite mineral, de acuerdo con el siguiente protocolo:

- a) Reactivación del microorganismo en caldo Dextrosa Sabouraud (BD Bioxon) e incubación en estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas.
- b) Siembra en estría .en agar Dextrosa Sabouraud (BD/Bioxon) e incubación en estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas.
- c) Realización de pruebas confirmatorias de pureza del microorganismo mediante observación macroscópica y microscópica por medio de tinción de Gram (Fig. 16).

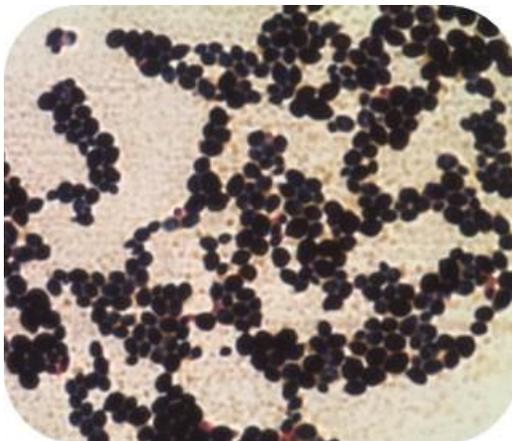


Fig. 16 Confirmación de pureza de microorganismo *C. albicans*

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

- **TERCERA FASE: Germinación de *Bacillus clausii***

Bacillus clausii

Fue obtenida de la presentación comercial *Enterogermina*® suspensión oral (2×10^9 UFC) (SANOFI, Bangladesh Ltd)(Fig.17), a partir de ella se obtuvo el microorganismo en sus dos formas morfológicas: Espora y célula vegetativa (Bacilo).



Fig. 17 Presentación comercial *B. clausii*, *Enterogermina*®

Espora:

Para su utilización como espora se obtuvo directamente de la ampolla sin alteración.

Bacilo o célula vegetativa:

Se estandarizó metodología, con el objetivo de obtener la célula vegetativa de *B. clausii*, para poder observarla tanto macro como microscópicamente y monitorear su germinación (de espora a bacilo) , en dos diferentes medios de cultivo (Infusión Cerebro Corazón y Dextrosa Sabouraud), siguiendo metodología reportada por Ripert y cols.(102) modificada :

-Medio de cultivo Infusión Cerebro corazón

1. Se realizaron diluciones seriadas, a partir de *Enterogermina*® (2×10^9) manteniendo constante el factor de dilución (1:10):

Se prepararon 9 tubos con 9 mL de solución salina estéril al 0.85%, los cuales fueron rotulados de acuerdo con la reducción logarítmica (Fig.18).

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.



Fig. 18 Tubos con solución salina estéril al 0.85% rotulados de acuerdo con reducción logarítmica para diluciones seriadas y ampolleta de Enterogermina®.

2. Se tomaron 1000 μL de suspensión de Enterogermina® (2×10^9) con una micropipeta y se colocaron en el primer tubo (2×10^8), posteriormente se agitó en vórtex (Thomas Scientific) a 3200 rpm, se tomaron 1000 μL de la solución de este, se trasladaron a el segundo tubo (2×10^7) y se agitó. Se repitieron los pasos anteriores sucesivamente en los tubos restantes (2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 , 2×10^2 , 2×10^1) hasta llegar a la concentración de 2×10 (Fig. 19).



Fig. 19 Diluciones seriadas de *B. clausii*. Colocación de 1 mL de solución del tubo número 1 al 2, posterior agitación en vórtex y se repite procedimiento.

3. Se seleccionaron aleatoriamente las concentraciones 2×10^5 , 2×10^2 y 2×10 , se tomaron 5 mL de cada tubo y se colocaron individualmente en matraces de 250 mL con 150 mL de caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón), se llevaron a incubación en estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en agitación constante a 380 rpm (Accuplate/Labnet) por 24 horas (Fig. 20).

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

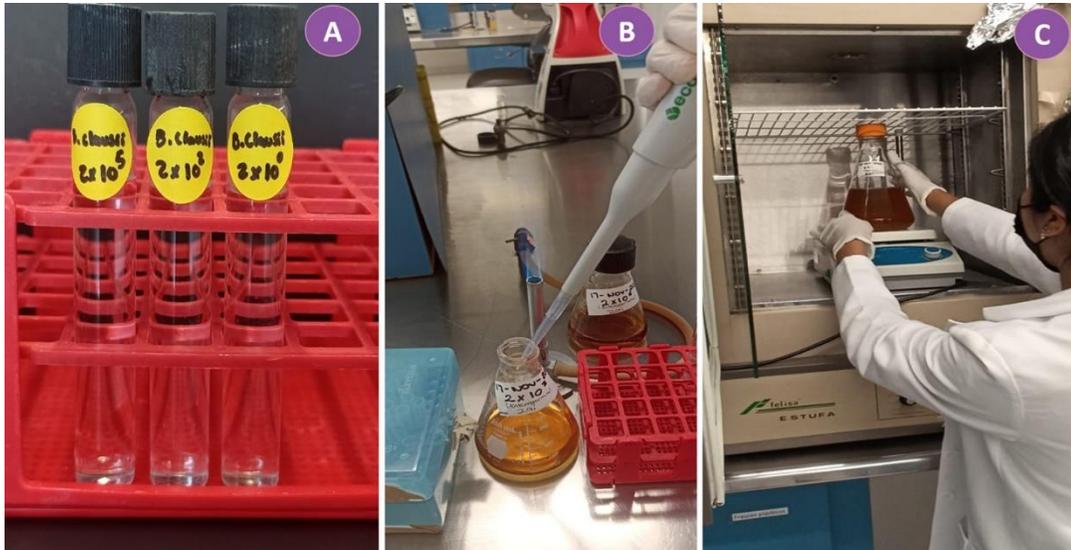


Fig. 20 (A). Concentraciones seleccionadas 2×10^5 , 2×10^3 y 2×10^1 , (B). Colocación de la dilución en 150 mL de medio de cultivo, (C). Incubación en agitación constante.

4. Se realizó la siembra de 100 μ L de cada una de las tres concentraciones en agar BHI, las placas se colocaron en estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas (Fig. 21).



Fig. 21 Siembra e incubación de *B. clausii*

5. Se llevó a cabo la observación macroscópica en microscopio estereoscópico (Leica EZ4D®) y tinción Gram de las tres concentraciones, con el fin de obtener la mejor concentración a utilizar. Se realizaron resiembras cada 24 horas para mantener el microorganismo en estado vegetativo hasta su uso.

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

6. Se realizaron pruebas experimentales, donde se pusieron en contacto 100 μL *E. faecalis* con una turbidez 0.5 McFarland y 1000 μL *B. clausii* (en forma de bacilo) a diferentes escalas de turbidez (3,5 y 7 McFarland) para determinar la concentración más efectiva de la forma vegetativa sobre *E. faecalis* (Fig.22).

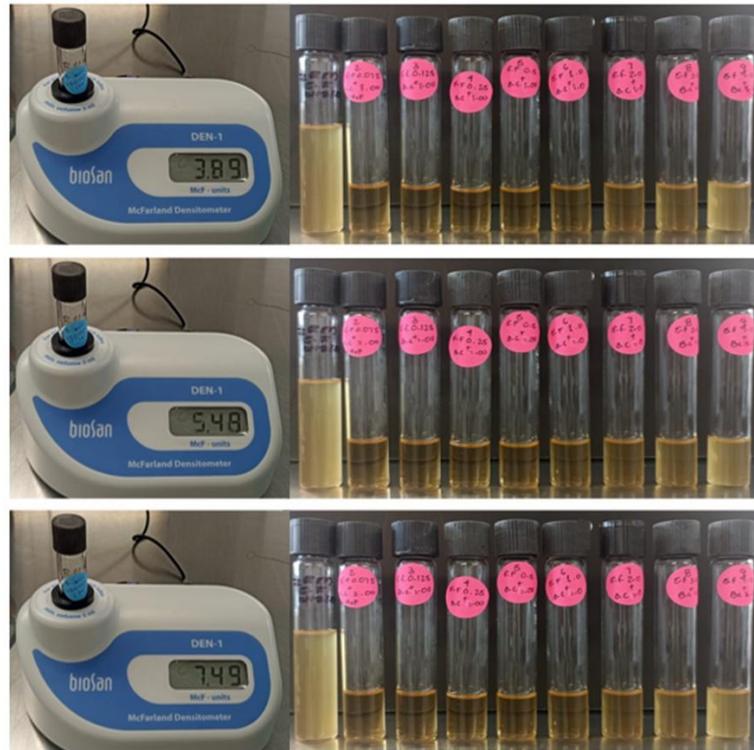


Fig. 22 Prueba de contacto entre *E. faecalis* y *B. clausii* de forma vegetativa a diferentes escalas McFarland

-Medio de cultivo Dextrosa Sabouraud

1. Se realizaron diluciones seriadas, a partir de Enterogermina® (2×10^9) manteniendo constante el factor de dilución (1:10):

Se prepararon 9 tubos con 9 mL de solución salina estéril al 0.85%, los cuales fueron rotulados de acuerdo con la reducción logarítmica. Se tomaron 1000 μL de suspensión de Enterogermina® (2×10^9) con una micropipeta y se colocaron en el primer tubo (2×10^8), posteriormente se agitó en vórtex (Thomas Scientific) a 3200 rpm, se tomaron 1000 μL de solución de este, se trasladaron a el segundo tubo (2×10^7) y se agitó. Se repitieron los pasos anteriores sucesivamente en los tubos restantes (2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 , 2×10^2 , 2×10^1) hasta llegar a la concentración de 2×10 .

2. Se seleccionaron aleatoriamente las concentraciones 2×10^5 , 2×10^2 y 2×10 , se tomaron 5 mL de cada tubo y se colocaron individualmente en matraces de 250 mL con 150 mL de caldo Dextrosa Sabouraud se llevaron a incubación en estufa

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

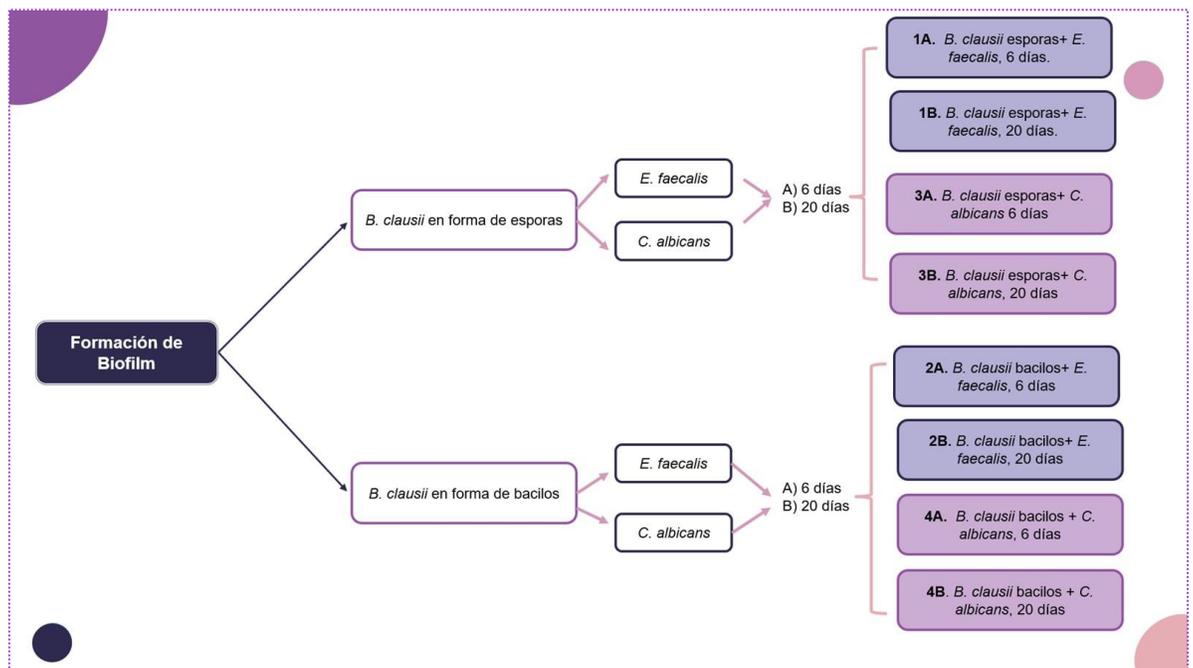
bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en agitación constante a 380 rpm (Accuplate/Labnet) por 24 horas.

3. Se realizó la siembra de 100 μL de cada una de las tres concentraciones en agar Dextrosa Sabouraud, las placas se colocaron en estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas.

4. Se llevó a cabo la observación macroscópica en microscopio estereoscópico (Leica EZ4D®) y tinción Gram de las tres concentraciones, con el fin de obtener la mejor concentración a utilizar. Se realizaron resiembras cada 24 horas para mantener el microorganismo en estado vegetativo hasta su uso.

5. Se realizaron pruebas experimentales, donde se pusieron en contacto *C. albicans* con una turbidez 0.5 McFaland y *B. clausii* (en forma de bacilo) a diferentes escalas de turbidez (3,5 y 7 McFarland) para determinar la concentración más efectiva de la forma vegetativa sobre *E. faecalis*.

- **CUARTA FASE: Formación de Biofilm por flujo laminar (Esquema 1)**



Esquema 1 Formación de Biofilm en grupos 1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B.

I. Formación de Biofilm de *B. clausii* + *Enterococcus faecalis*

Grupo 1A y 1B *Bacillus clausii* en esporas + *E. faecalis* (n=8):

1. En dos matraces independientes de 250 mL con 100 mL de caldo BHI se colocaron ocho raíces estandarizadas en cada uno, posteriormente se agregaron 100 μ L de *Enterococcus faecalis* a una escala 0.5 McFarland (1.5×10^8 UFC/mL) y 1000 μ L de esporas *B. clausii* (2×10^9 UFC/mL), se incubaron en estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 6 y 20 días respectivamente.
2. Cada 48 horas se realizaron recambios de medio de cultivo BHI, y se realiza tinción de Gram para corroborar pureza de los microorganismos *E. faecalis* y esporas *B. clausii*, así como la observación morfológica microscópica.

Grupo 2A y 2B *Bacillus clausii* forma vegetativa + *E. faecalis* (n=8):

1. En dos matraces independientes de 250 mL con 100 mL de caldo BHI se colocaron ocho raíces estandarizadas en cada uno, posteriormente se agregaron 100 μ L de *Enterococcus faecalis* a una escala 0.5 McFarland (1.5×10^8 UFC/mL) y 1000 μ L de *B. clausii* en forma vegetativa a una escala de 7.0 McFarland (21×10^8 UFC/mL), se incubaron en estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 6 y 20 días.
2. Cada 48 horas se realizaron cambios de medio de cultivo BHI, tinción Gram para corroborar pureza de los microorganismos y observación morfológica microscópica (Fig.23).



Fig. 23 Formación de Biofilm *B. clausii* + *E. faecalis*, grupos 1A,1B,2A y 2B.

Control Positivo:

Grupos 1A, 2A, 1B, 2B (n=4):

1. En dos tubos independientes con 9 mL de caldo BHI se colocaron 4 raíces estandarizadas en cada uno, junto con 100 μ L de *Enterococcus faecalis* a una escala 0.5 McFarland más 1 mL de solución salina estéril 0.85%, durante 6 y 20 días. Cada 48 horas se realizaron cambios de medio de cultivo BHI, tinción Gram para corroborar pureza de los microorganismos y observación morfológica microscópica.

Control Negativo

Grupos 1A, 2A, 1B, 2B (n=4):

En un tubo con 9 mL de caldo BHI se colocaron 4 raíces estandarizadas, durante 6 días(Fig.24).



Fig. 24 Control negativo y positivo.

II. Formación de Biofilm de *B. clausii* + *Candida albicans*

Grupo 3A y 3B *Bacillus clausii* esporas + *C. albicans* (n=8):

1. En dos matraces independientes de 250 mL con 100 mL de caldo Dextrosa Sabouraud se colocaron ocho raíces estandarizadas en cada uno, posteriormente se agregaron 100 μ L de *Candida albicans* a una escala 0.5 McFarland (1.5×10^8 UFC/mL) y 1000 μ L de esporas *B. clausii* (2×10^9 UFC/mL), se incubaron en estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 6 y 20 días respectivamente.

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

2. Cada 48 horas se realizaron cambios de medio de cultivo Dextrosa sabouraud, tinción Gram para corroborar pureza de los microorganismos y observación morfológica microscópica.

Grupo 4A y 4B *Bacillus clausii* en forma vegetativa + *C. albicans* (n=8):

1. En dos matraces independientes de 250 mL con 100 mL de caldo Dextrosa Sabouraud se colocaron ocho raíces estandarizadas, posteriormente se agregaron 100 μ L de *Candida albicans* a una escala 0.5 McFarland (1.5×10^8 UFC/mL) y 1000 μ L de *B. clausii* en forma vegetativa a una escala de 7.0 McFarland (21×10^8 UFC/mL), se incubaron en estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 6 y 20 días.

2. Cada 48 horas se realizaron cambios de medio de cultivo Dextrosa sabouraud, tinción Gram para corroborar pureza de los microorganismos y observación morfológica microscópica (Fig.25).



Fig. 25 Formación de Biofilm *B. clausii* + *C. albicans*, grupos 1A,1B,2A y 2B. A. Medios de cultivo y muestras. B. Escala McFarland de Microorganismos. C. colocación de muestras. D. Tinción Gram.

Control Positivo:

Grupos 3A, 4A, 3B, 4B (n=4):

En dos tubos con 9 mL de caldo Dextrosa sabouraud se colocaron 2 raíces estandarizadas en cada uno, junto con 100 μ L de *Candida albicans* a una escala 0.5 McFarland más 1 mL de solución salina estéril 0.85%, durante 6 y 20 días. Cada 48 horas se realizaron cambios de medio de cultivo, tinción Gram para corroborar pureza de los microorganismos y observación morfológica microscópica.

Control Negativo:

Grupos 3A, 4A, 3B, 4B (n=4):

En un tubo con 9 mL de caldo BHI se colocaron 4 raíces estandarizadas, durante 6 días.

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.



Fig. 26 Grupos Experimentales. Marcados con rojo Grupo *E. faecalis* y con verde grupos de *C. albicans*.

- **QUINTA FASE: observación en Microscopio Estereoscópico y Preparación para observación en Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)**

Cumplidos los diferentes intervalos de tiempo de cada grupo todas las muestras fueron preparadas para su observación en el Microscopio estereoscópico y en el MEB.

Las muestras fueron seccionadas, longitudinalmente en dos mitades simétricas, con ayuda de un disco de diamante de 0.15 mm de espesor y pieza de baja velocidad (Anelsam), fueron observadas en el microscopio estereoscópico a 40X (Leica) (Fig. 27), y se realizaron registros fotográficos, posteriormente los especímenes fueron preparados de acuerdo con el protocolo para el manejo de especímenes biológicas para su observación en el MEB, siguiendo los pasos que se enumeran a continuación:

- a) Fijación
- b) Deshidratación
- c) Secado a punto crítico
- d) Recubrimiento con oro
- e) Lectura de las muestras

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

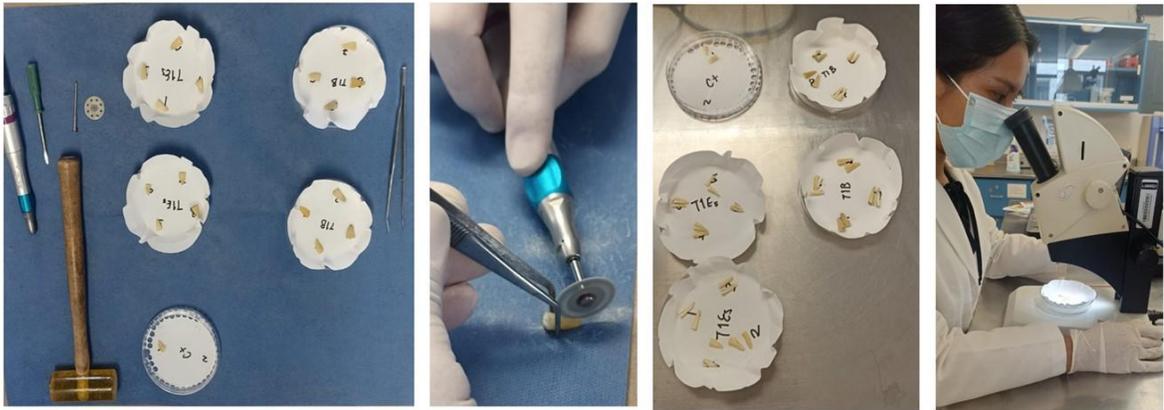


Fig. 27 Sección de las muestras con disco de diamante de 0.15 mm de grosor y observación macroscópica.

a) Fijación de las muestras: Las muestras se colocan en 10 mL de glutaraldehído 2% (SIGMA-ALDRICH solución de glutaraldehído Grado I al 25%) preparado para microscopía electrónica, con 10 ml de colorante azul de alcian 8GX (SIGMA-ALDRICH) al 1% con un pH de 2.5 y se almacenaron en tubos eppendorf sellados con parafilum durante 24 horas a 4°C.

b) Deshidratación: Las muestras fueron lavadas con solución buffer fosfato para eliminar los excedentes, posteriormente fueron sometidas al proceso de deshidratación por medio de alcoholes crecientes, etanol anhidro reactivo (Fermont, Productos Químicos de Monterrey, S.A de C.V., México) al 20%, 40%, 60%, 80%, 90% y 95% durante 10 minutos entre cada uno de ellos para finalmente ser almacenados en alcohol al 99.98%.

c) Secado a punto crítico: Las muestras se colocan en unas cápsulas sumergidas en acetona al 100% (J.T. Baker) sin entrar en contacto con el ambiente para poder realizar el procedimiento; después de ser colocadas en las cápsulas se llevaron al equipo de punto crítico de CO₂ (Critical Point Dryer CPD 020 Balzers Union) con 7 intercambios de CO₂ con una duración aproximada de 2 horas; terminado el intercambio de acetona por CO₂, las muestras fueron retiradas del equipo y se colocaron en tubos eppendorf sellados herméticamente, para ser introducidas en un desecador al vacío con sílica desecante (Fig. 28).

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.



Fig. 28 Fijación de muestras, deshidratación en alcoholes a porcentajes crecientes y secado a punto crítico.

d) Recubrimiento de oro: Las muestras fueron colocadas y selladas con cinta de carbón en dispositivos de lectura con placas de doble carbón para recubrirse con oro (SPI-MODULE™ Sputter Coater) (Fig.29).

e) Lectura de las muestras: Las muestras fueron leídas en el Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JMS-6510LV, Japón) bajo magnificación variable en el Doctorado de Ciencias Odontológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



Fig. 29 Recubrimiento de oro. Las muestras se colocan primero dentro del Sputter coater para el recubrimiento y posteriormente se introducen en el MEB.

6. RESULTADOS

Con el fin de dar un orden a los resultados se presentarán conforme a los objetivos establecidos de la siguiente manera:

Resultados de la conversión de esporas de probiótico comercial a bacilos, de acuerdo a la técnica de Ripert y cols.(102) modificada para este estudio. En primer lugar, se realizó la observación microscópica mediante tinción Gram de la suspensión de esporas de *Bacillus clausii* (Enterogermina®). A un aumento de 100X se observaron esporas circulares bien definidas, con contorno continuo, simétricas y en gran cantidad (Fig.30).

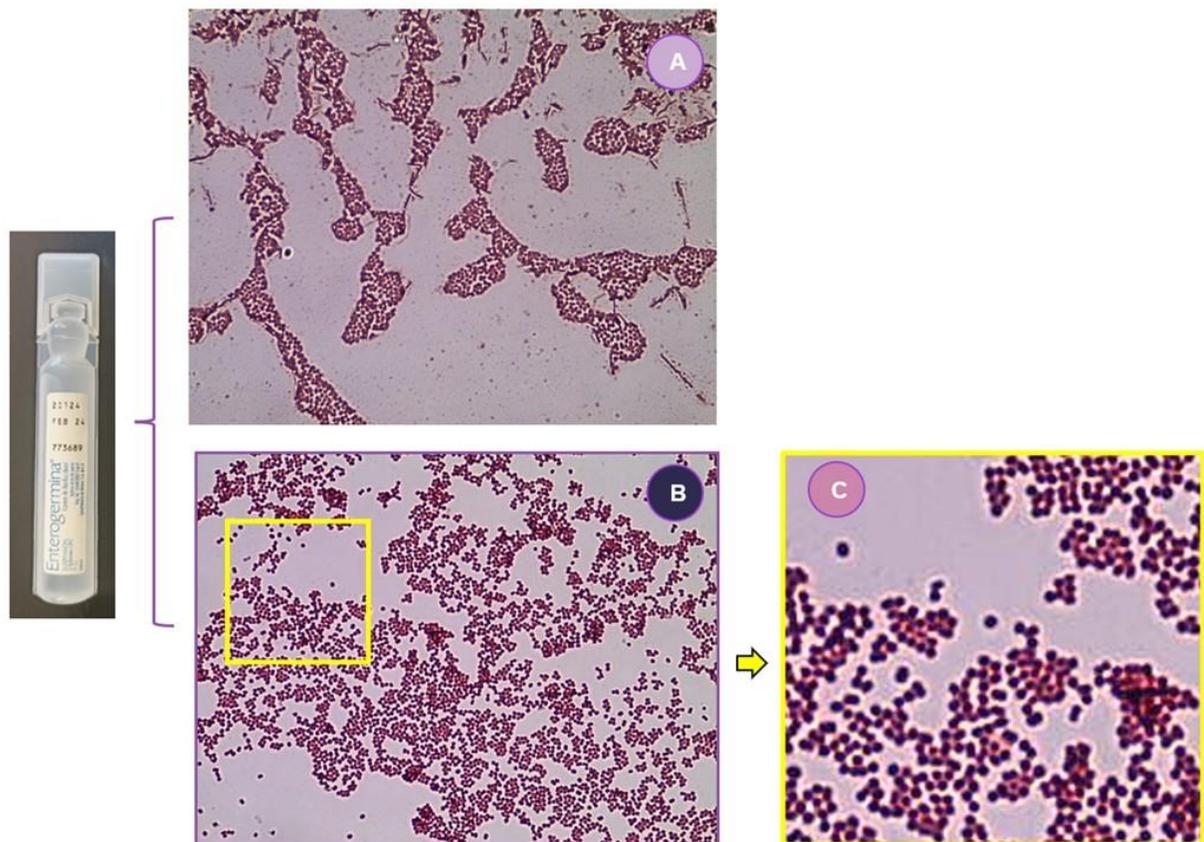


Fig. 30 (A) y (B) Observación macroscópica de esporas de *B. clausii* obtenidas de la presentación comercial Enterogermina®. Acercamiento en (C) de zona en amarillo, esporas definidas y circulares.

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

Observamos durante la monitorización del proceso de germinación esporas de *B. clausii* en estado de transición a una célula vegetativa, en la (Fig. 31) se aprecia con detalle la presencia de ambas morfologías del probiótico.

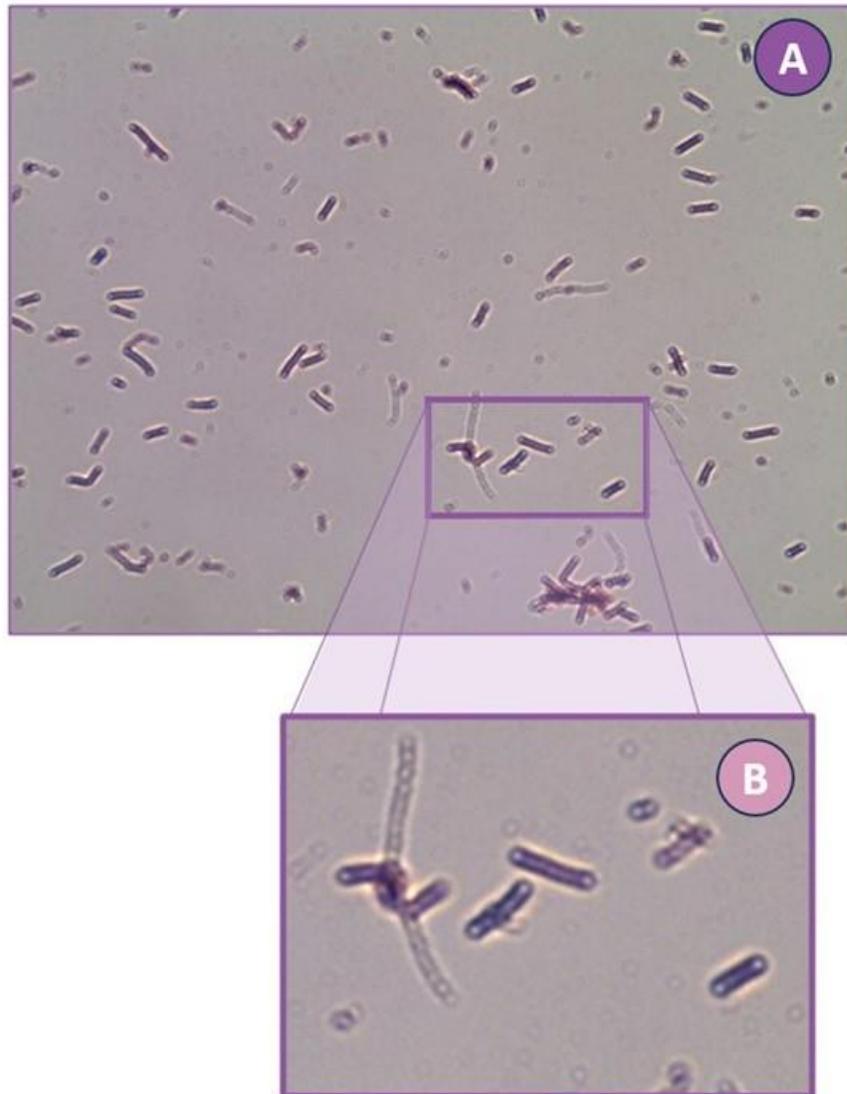


Fig. 31 Observación en (A) a 100X las esporas de *B. clausii* en proceso de germinación. En (B) se aprecia un acercamiento a la zona señalada, en donde se observa la transición a célula vegetativa incipiente y algunas esporas.

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

Mediante el proceso de germinación se pudo obtener *Bacillus clausii* en su forma vegetativa. Se sembraron en agar tres diferentes concentraciones McFarland del bacilo (3.0, 5.0 y 7.0 McFarland), a las 24 horas se realizó la observación microscópica para evaluar su comportamiento (Fig.32), a una escala 3.0 se observa el probiótico en forma vegetativa con poca presencia y algunas esporas, mientras que a una escala 5.0 se observan bacilos en mayor cantidad y con una estructura más alargada, a una escala 7.0 notamos un contraste en cuanto a presencia del bacilo, se observaron superpoblados y en una disposición reticular, con estas observaciones se decidió elegir la concentración 7.0 McFarland para los siguientes procedimientos.

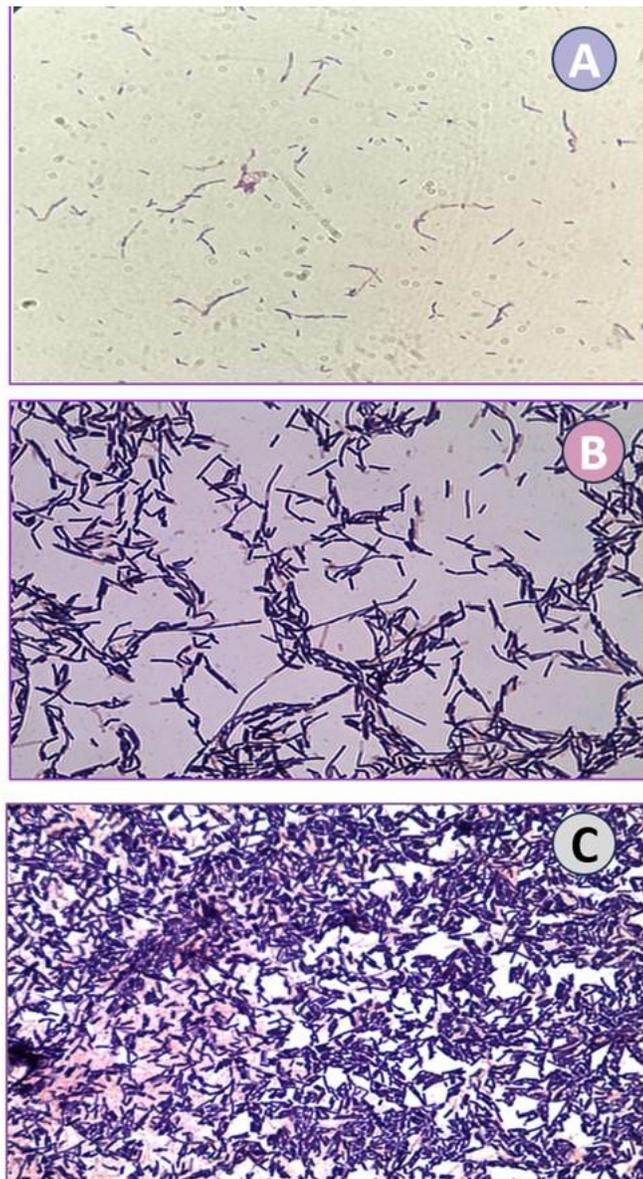


Fig. 32 *Bacillus clausii* en estado vegetativo a diferentes escalas McFarland (A) 3.0 McFarland, (B) 5.0 McFarland, (C) 7.0 McFarland, podemos observar los diferentes patrones de crecimiento en cada concentración.

Observación macroscópica de *B. clausii* en estado vegetativo a escala 7.0 McFarland a las 24 horas.

Se realizó el seguimiento macroscópico un día después de la siembra en agar con ayuda de un microscopio estereoscópico a 35X, se observaron colonias de forma irregular, de elevación convexa y margen entero (Fig. 33).

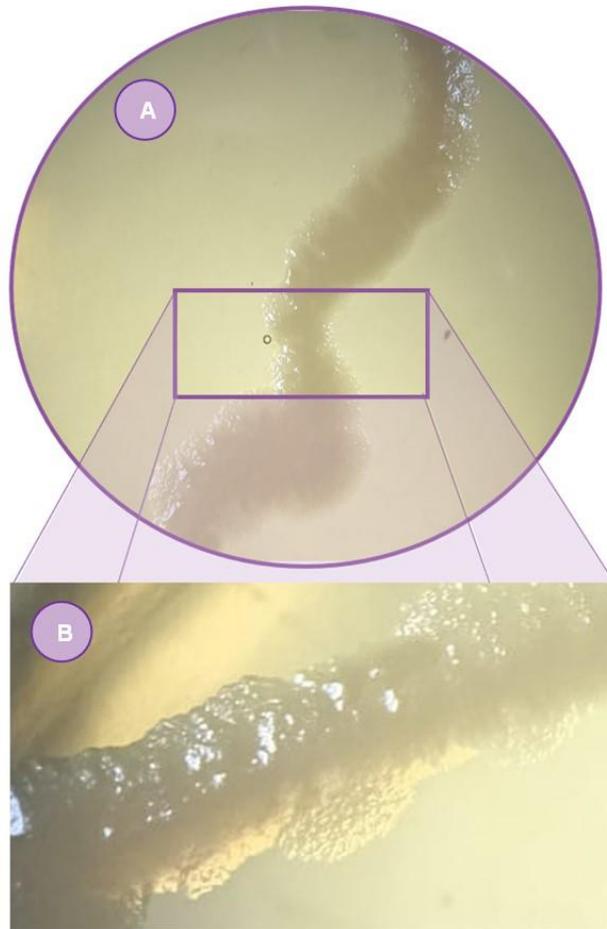


Fig. 33 Desarrollo de *Bacillus clausii* a 24 horas de germinación en escala McFarland 7.0.

En cuanto al objetivo 2 se muestran resultados del contacto de *Bacillus clausii* en forma vegetativa con *Enterococcus faecalis* en forma planctónica a 24 horas.

Mediante tinción de Gram se hicieron observaciones a las 24 horas de contacto de ambos microorganismos. Identificamos predominio de *E. faecalis* con poca supervivencia de *B. clausii*, así como aglomeraciones de *E. faecalis* sobre algunos bacilos. Este comportamiento podría ser un mecanismo de competencia por nutrientes y supervivencia (Fig. 34).

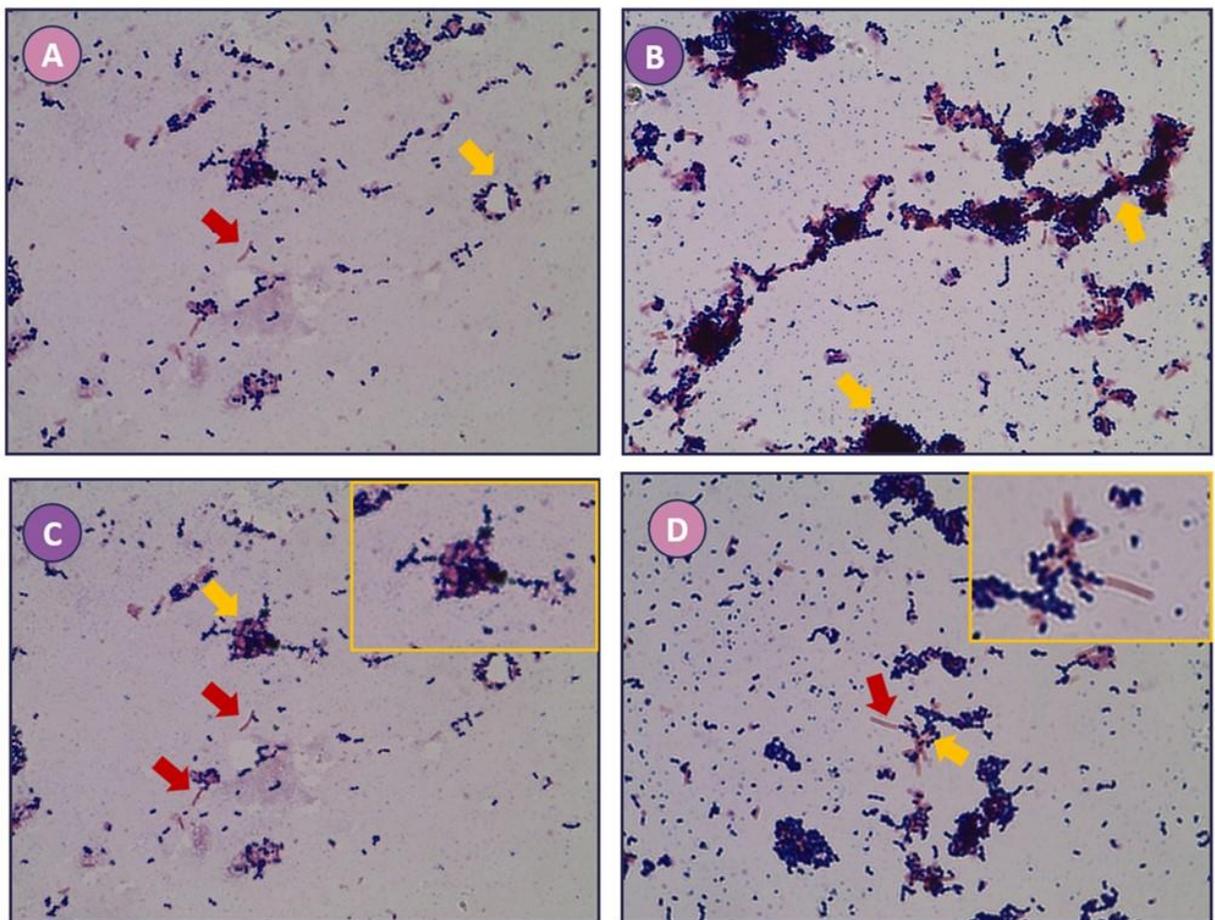


Fig. 34 Tinciones Gram observadas en microscopio óptico a 100X, 24 horas después del contacto entre microorganismos, se observa predominio de *E. faecalis*, pero con supervivencia de *B. clausii* (señalizados con flecha roja), así como aglomeraciones de *E. faecalis* sobre *B. clausii* (Flecha amarilla) en (C) y (D) aumento de las aglomeraciones.

Resultados del objetivo 3 en cuanto a contacto de *Bacillus clausii* en forma vegetativa con *Candida albicans* en forma planctónica a 24 horas.

A las 24 horas del contacto entre *C. albicans* y *Bacillus clausii* se observan de igual manera aglomeraciones de los bacilos y *C. albicans*, pero con un equilibrio en la cantidad de ambos microorganismos. En la Figura 35 se pueden observar algunos de los comportamientos observados, en la Fig. 35C denota la mínima presencia de *C. albicans* y el aumento de bacilos.

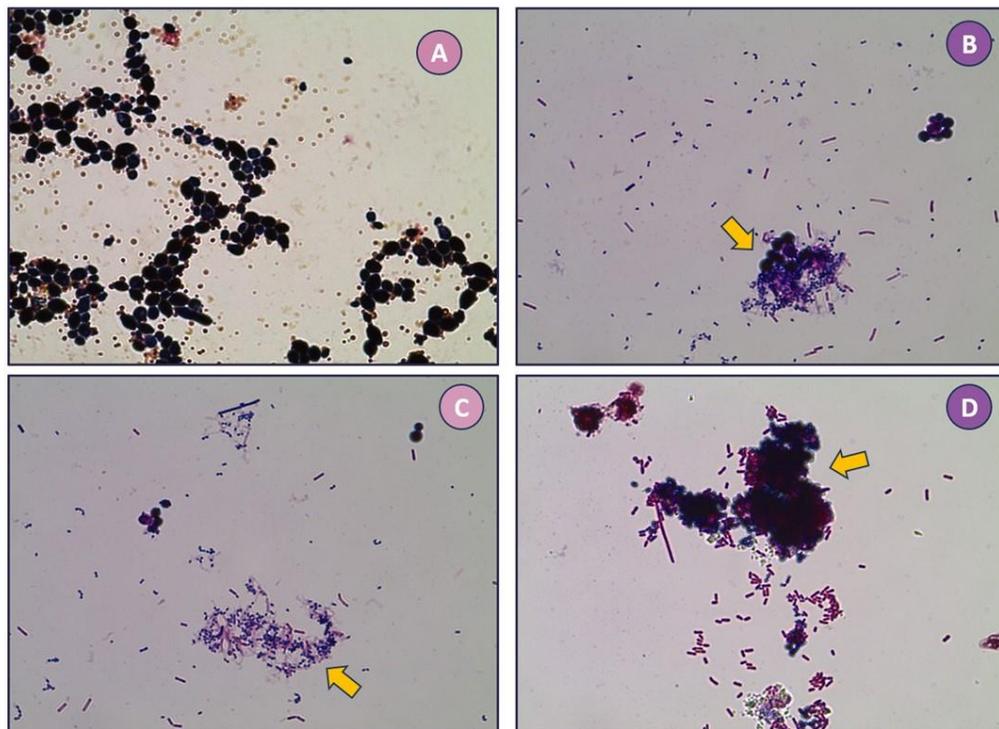


Fig. 35 Tinciones Gram observadas en microscopio óptico a 100X, 24 horas después del contacto de los microorganismos. Se observa equilibrio entre ambos microorganismos. Nuevamente se detectan aglomeraciones ,señalizadas con amarillo.

Resultados de la formación del Biofilm

Resultados de la observación Macroscópica de las muestras en microscopio estereoscópico a 35X(Fig. 36), pudimos observar conductos permeables y con amplitud apical suficiente para la formación del biofilm.

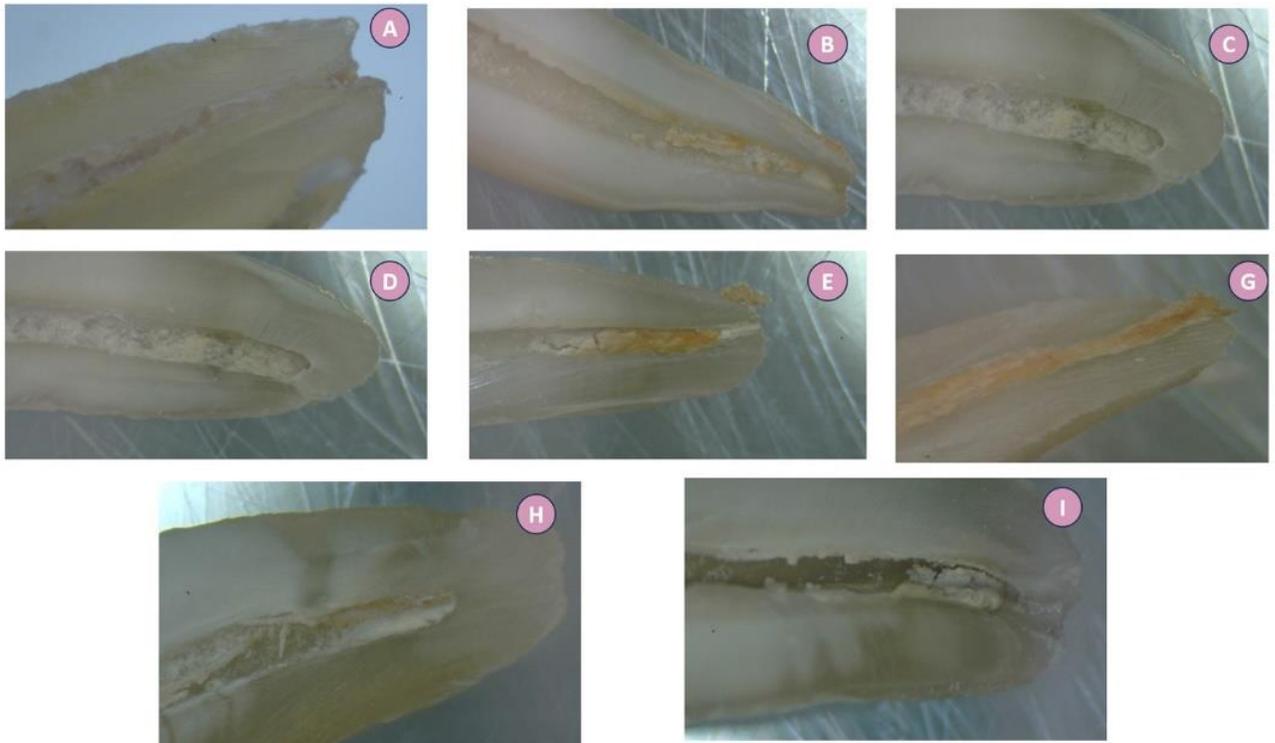


Fig. 36 Observación macroscópica de muestras post formación de Biofilm. (A) Grupo 1A- Esporas de *B. clausii* con *E. faecalis* 6 días. (B) Grupo 1B- Esporas de *B. clausii* con *E. faecalis* 20 días. (C) .Grupo 3A - Esporas de *B. clausii* con *C. albicans* 6 días, (D) Grupo 3B Esporas de *B. clausii* con *C. albicans* 20 días.(E) Grupo 2A- *B. clausii* vegetativo con *E. faecalis* 6 días, (F)Grupo 2B *B. clausii* vegetativo con *E. faecalis* 20 días. (G) Grupo 4A *B. clausii* vegetativo con *E. faecalis* 20 días. (H) Grupo 4B *B. clausii* vegetativo con *C. albicans* 20 días.(I) Grupo 1A- Esporas de *B. clausii* con *E. faecalis* 6 días.

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

Resultados del objetivo 4 formación de Biofilm de *Enterococcus faecalis* con *Bacillus clausii* (en forma esporulada y vegetativa) a 6 y 20 días se obtuvieron las siguientes micrografías al MEB.

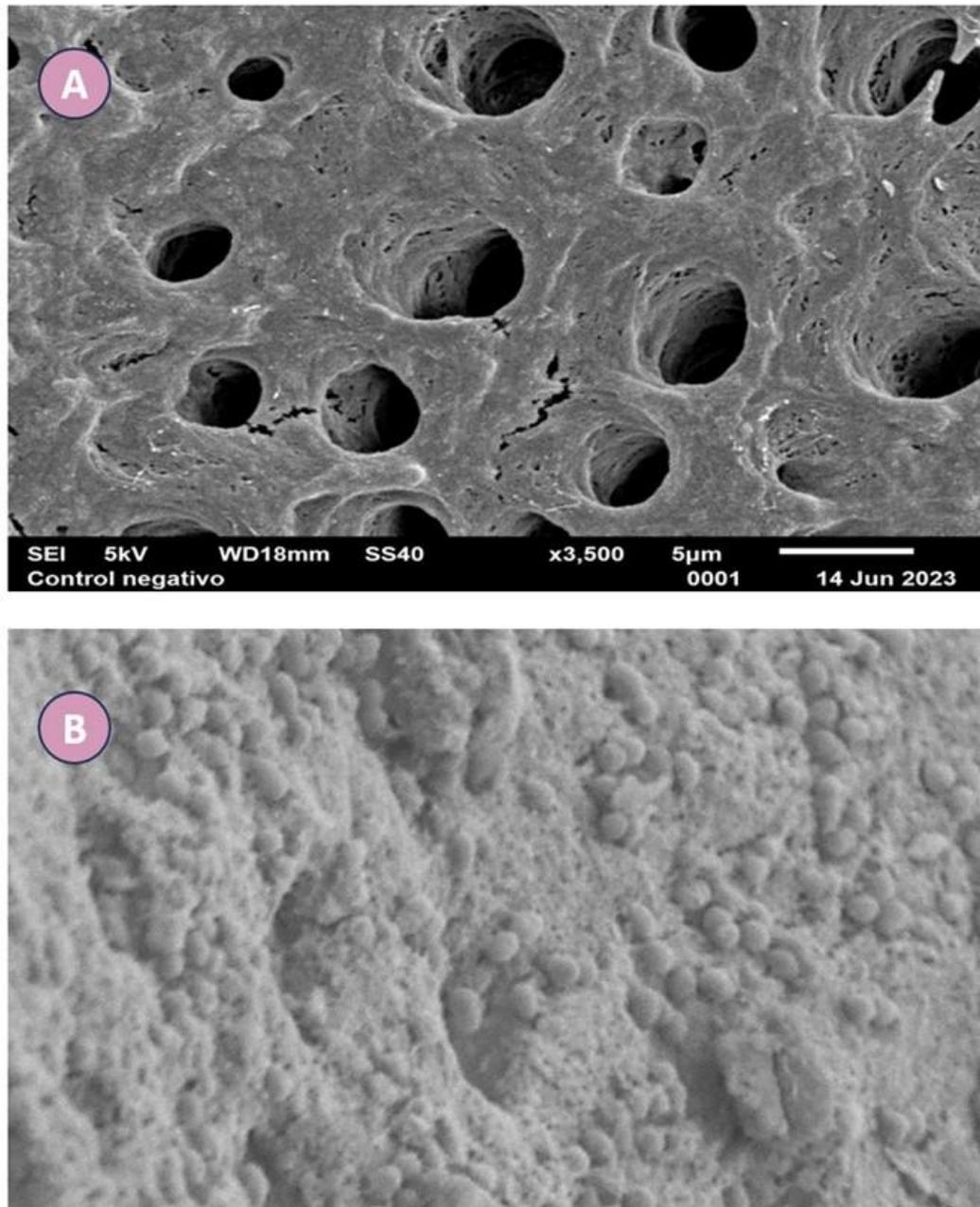


Fig. 37 (A) Control negativo, se observa completa permeabilidad de túbulos dentinarios. (B) Control de formación de Biofilm de *E. faecalis*, no se observa ningún túbulo abierto.

Grupo 1A: Esporas de *Bacillus clausii* con *Enterococcus faecalis* 6 días.

En este grupo Se observó algunos túbulos abiertos, presencia de esporas de un tamaño promedio de 0.5 μm , también identificamos la presencia de *Enterococcus faecalis*, pero sin la formación de un Biofilm maduro, sin embargo, en una micrografía a 7500X se observó un Biofilm de *E. faecalis* con esporas de *B. clausii* (Fig. 38)

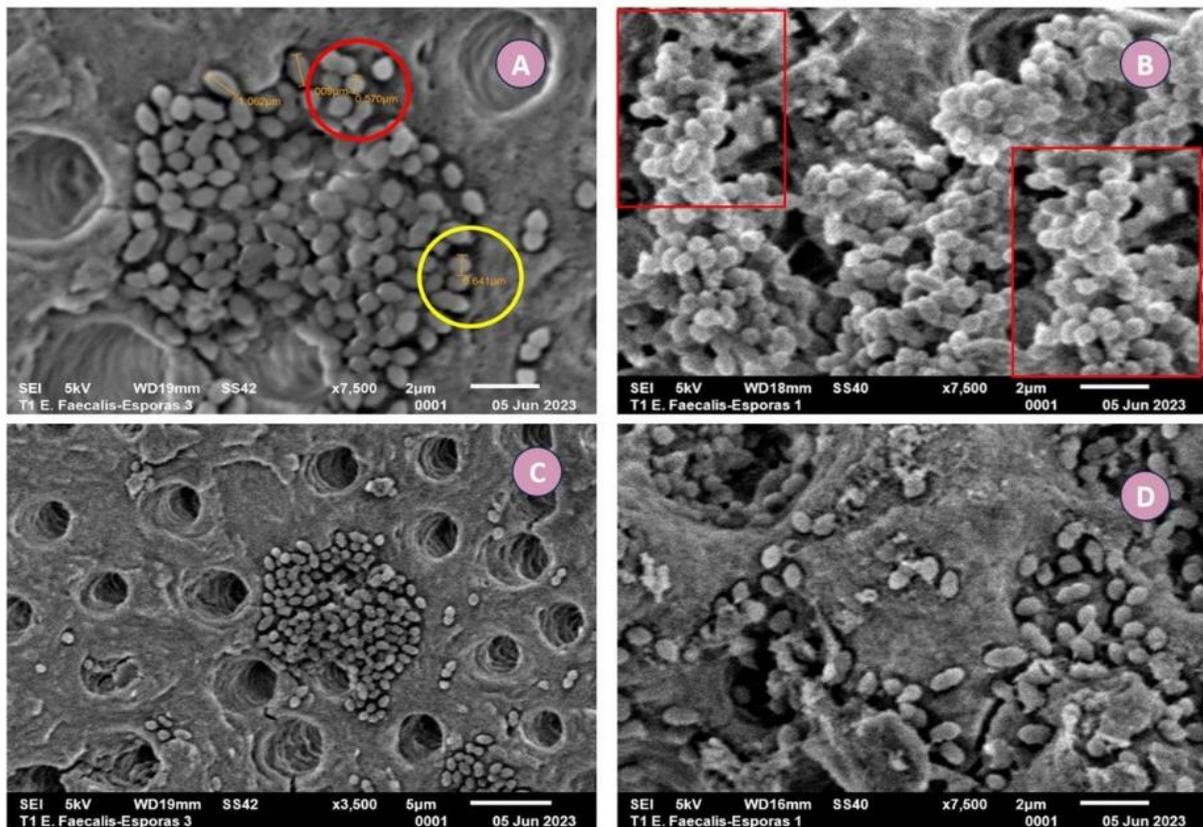


Fig. 38 Micrografías de Grupo 1A. (A) Señalados con rojo y amarillo esporas de tamaño 0.5 μm . (B) Biofilm de *E. faecalis* y Esporas de *B. clausii*, ampliación de zona señalizada en rojo, se aprecia la forma característica de las esporas. (C) y (D) Presencia de túbulos abiertos, esporas y cocos, sin formación de un Biofilm maduro.

Grupo 1B Esporas *Bacillus clausii* con *Enterococcus faecalis* 20 días.

Se observó presencia tanto de esporas como cocos, zonas con formación de un biofilm maduro con interrupciones en su continuidad por zonas con esporas con algunos túbulos abiertos (Fig. 39).

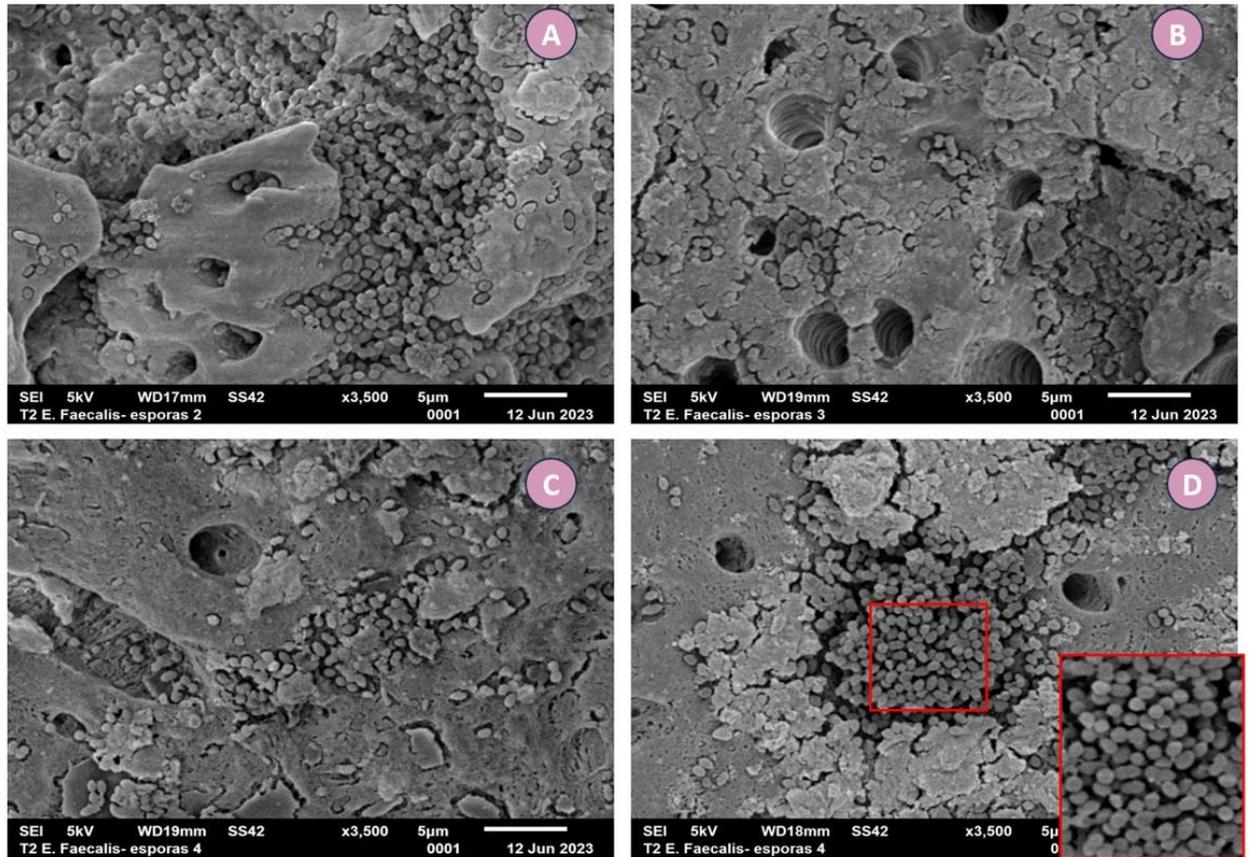


Fig. 39 Micrografías grupo 1B. (A) Población de esporas en el centro, rodeadas por biofilm en capas de *E. faecalis*. (B) Capas de Biofilm en contacto con esporas y túbulos despejados.(C) Combinación de *E. faecalis* y esporas en pared dentinaria en apical. (D) Esporas interrumpiendo continuidad de Biofilm, en rojo magnificación de la zona señalada donde observamos esporas circulares definidas.

Grupo 2A *Bacillus clausii* vegetativo con *Enterococcus faecalis* 6 días.

Se observó en algunas muestras la formación de un biofilm maduro con presencia de esporas, cocos y bacilos, mientras que en otras zonas se observaron túbulos abiertos con presencia de esporas y bacilos no agrupados en biofilm (Fig. 40)

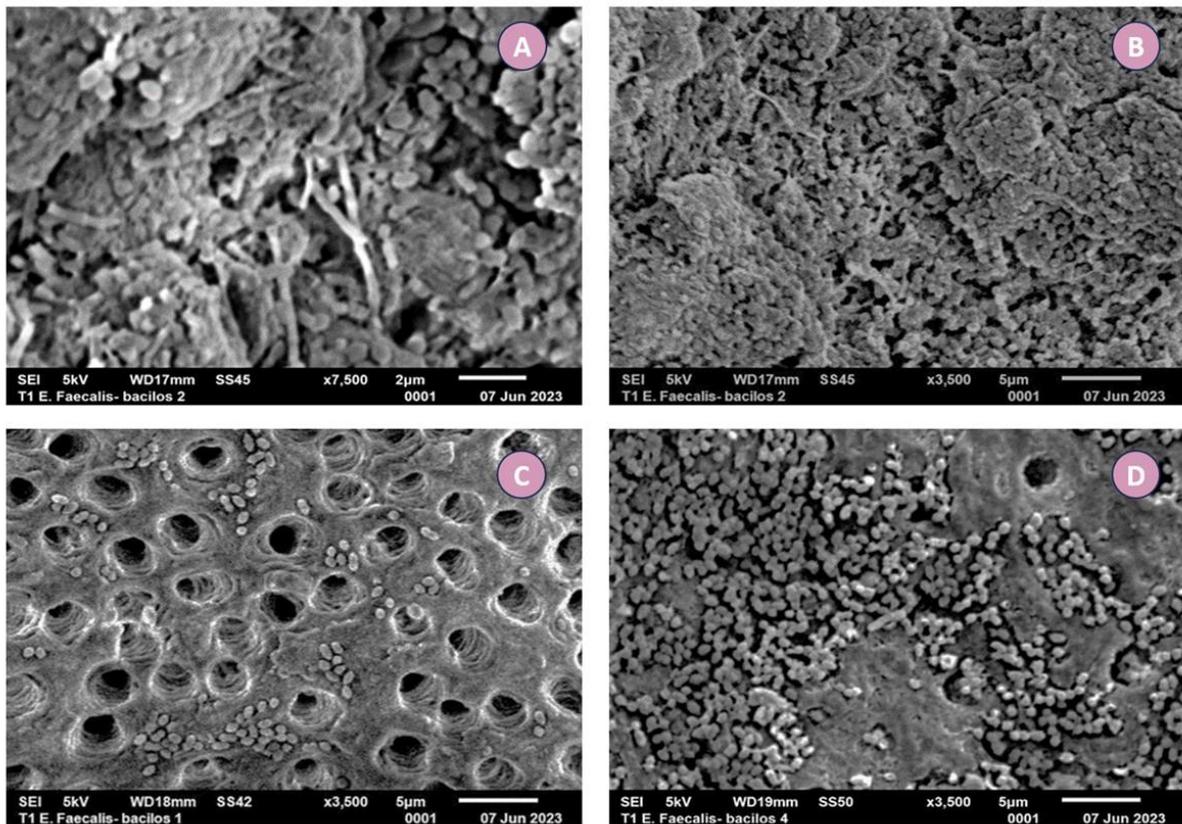


Fig. 40 (A) y (B) Biofilm maduro con presencia tanto de bacilos, esporas y *E. faecalis*. En (C) y (D) Presencia de esporas con túbulos abiertos.

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

Grupo 2B *Bacillus clausii* vegetativo con *Enterococcus faecalis* 20 días.

A los 20 días se observó en micrografías la formación de un Biofilm maduro multilaminar con presencia de algunos túbulos abiertos, *E. faecalis* y mínima cantidad de formas bacilares (Fig. 41).

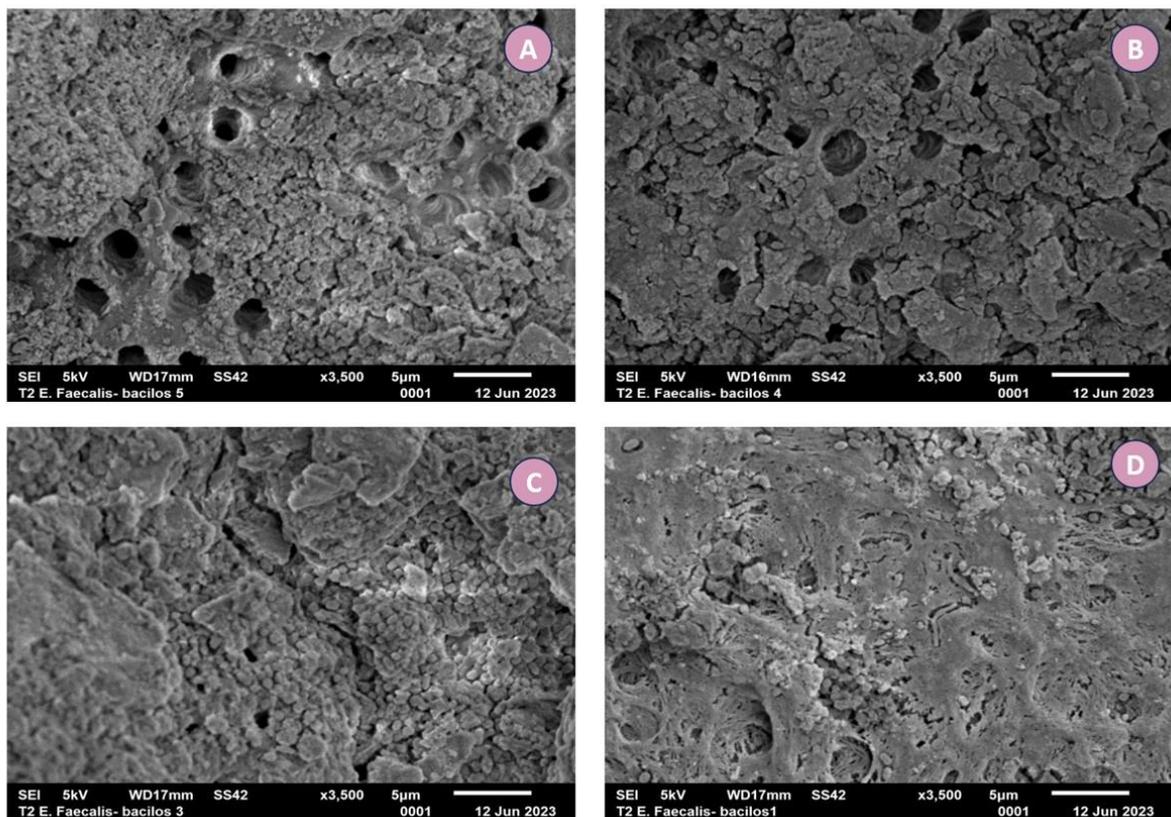


Fig. 41 Micrografías Grupo 2B. (A), (B), (C) y (D) Se observa presencia de Biofilm maduro multilaminar, en algunas zonas túbulos abiertos y presencia de bacilos.

En cuanto al objetivo 5 los resultados de la observación de Biofilm de *Candida albicans* con *Bacillus clausii* (en forma esporulada y vegetativa) a 6 y 20 días se obtuvieron las siguientes micrografías al MEB.

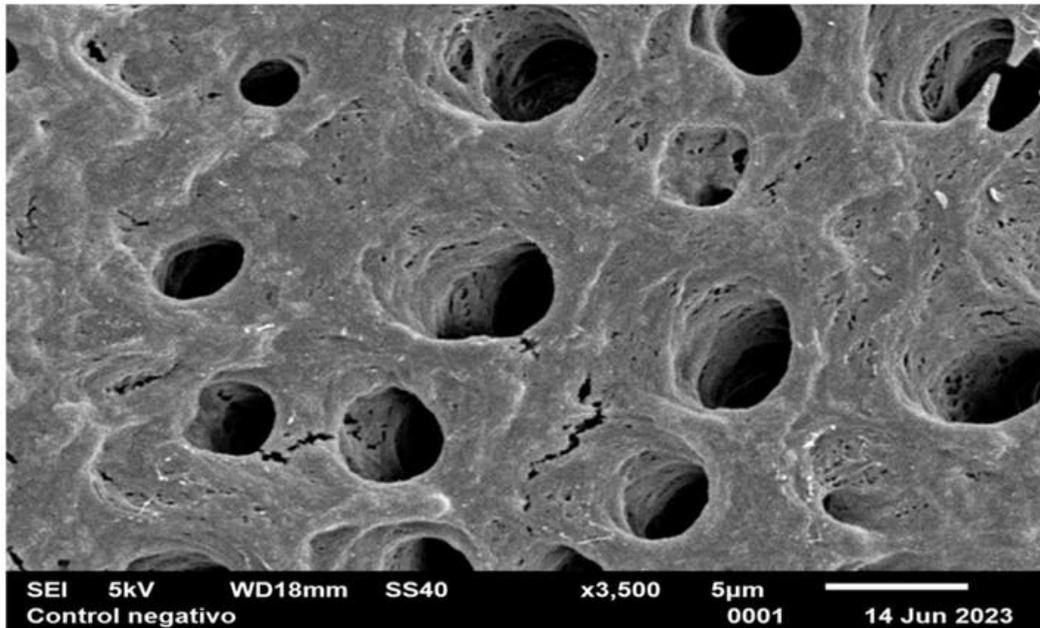


Fig. 42 Control Negativo, túbulos permeables.

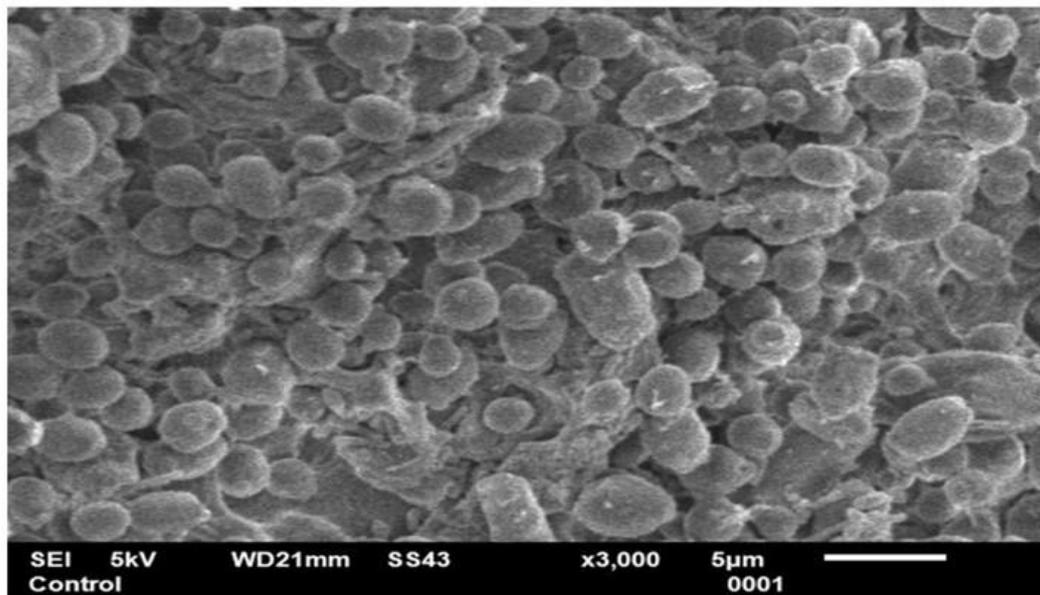


Fig. 43 Control de formación de Biofilm *Candida albicans*.

Grupo 3A *Bacillus clausii* esporas con *Candida albicans* 6 días.

En las muestras de este grupo se observó colonización de esporas de *Bacillus clausii*, circulares con contorno continuo, la pared dentinaria con túbulos aparentemente abiertos, por otro lado, *Candida albicans* con daño en su pared celular y pérdida de su estructura(Fig.44).

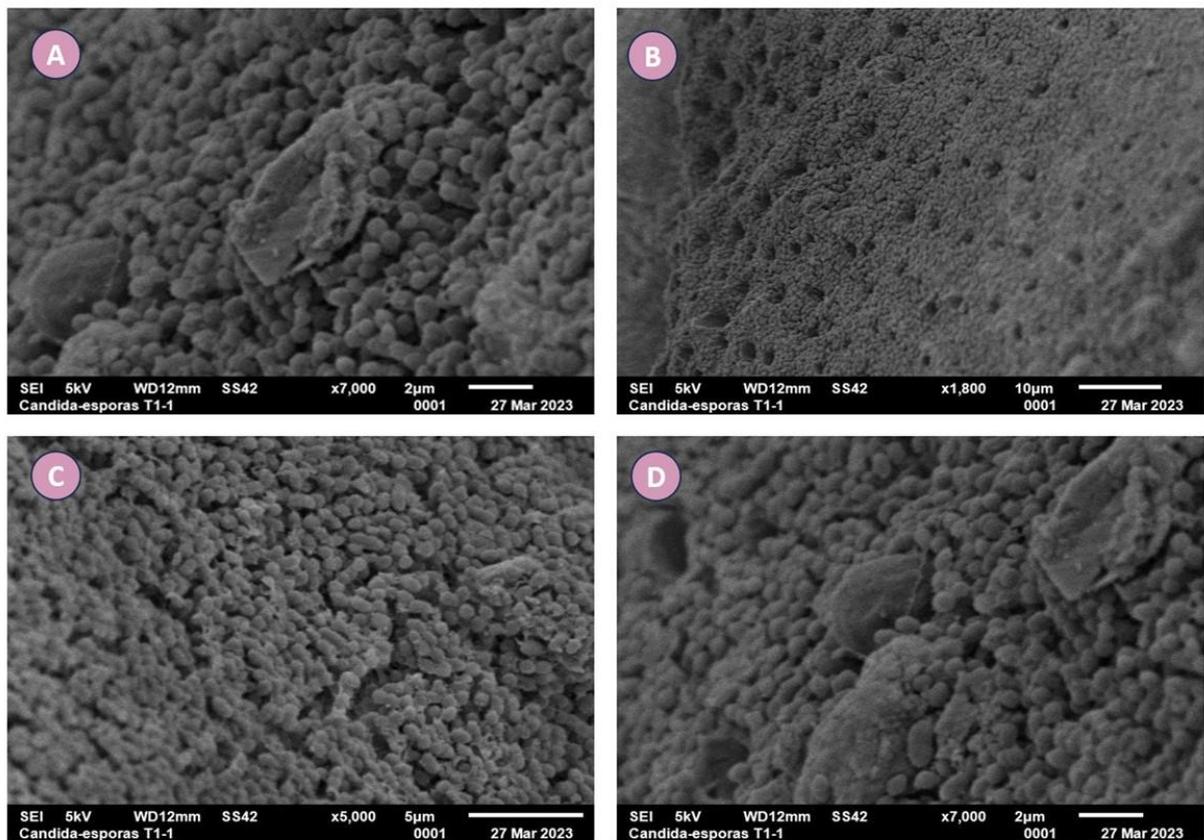


Fig. 44 Micrografías Grupo 3A. (A) Colonización de esporas de *Bacillus clausii*, se observa *C. albicans* con daño en pared celular y pérdida de su estructura. (B) Esporas en todo el campo con túbulos abiertos aparentes. (C) Esporas a 5,000X, se observa su estructura definida y ausencia de división celular. (D) Presencia de *C. albicans* una con estructura normal rodeada por esporas y otra con lisis de la pared celular.

Grupo 3B *B. clausii* esporas con *Candida albicans* 20 días.

En este grupo se observó colonización de esporas de *Bacillus clausii*, con algunas formas bacilares. Mínima presencia de *Candida albicans*, también con pérdida de su estructura. A 2,300X se identificó un Biofilm homogéneo de *Bacillus clausii* (Fig. 45).

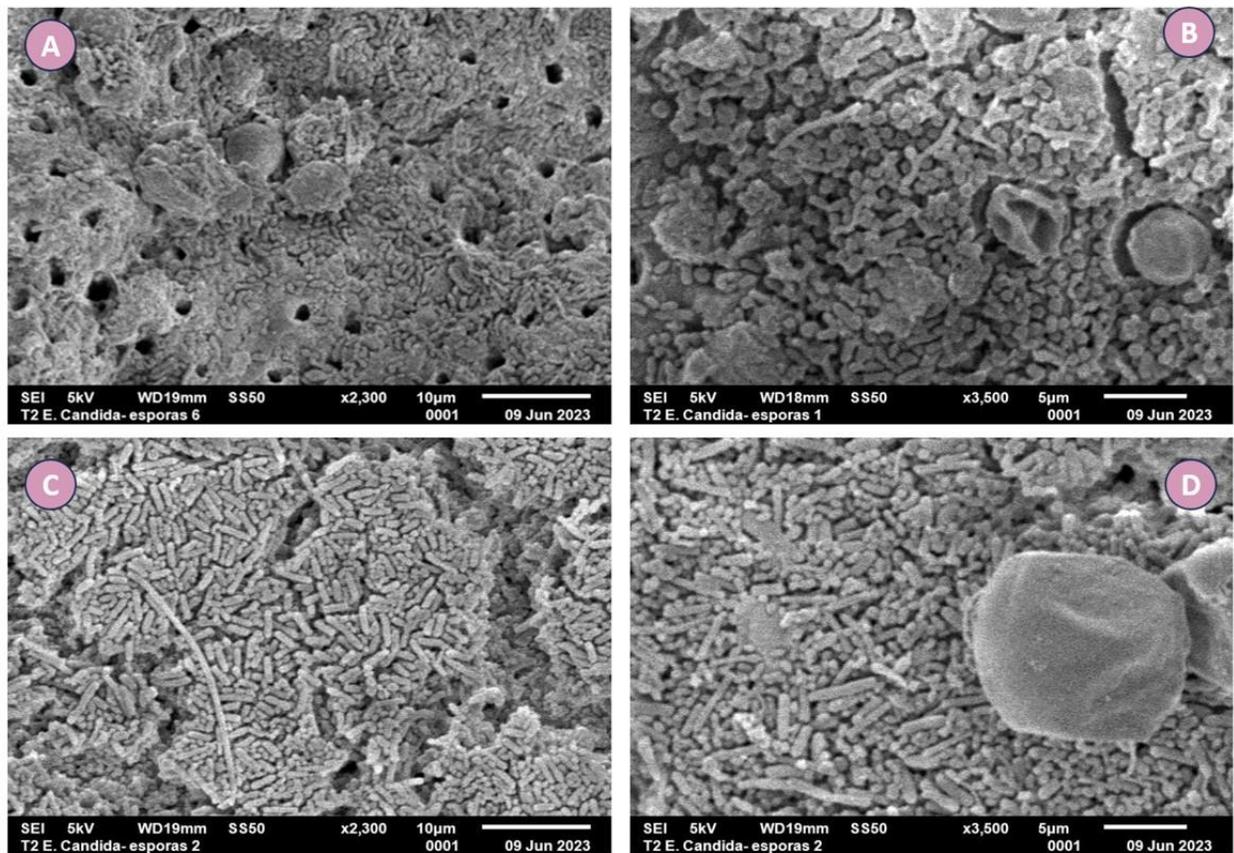


Fig. 45 Grupo 3B En todas las muestras se observó colonización de *Bacillus clausii* en forma de esporas y bacilos. *Candida albicans* con pérdida de estructura. En (C) Biofilm homogéneo de *Bacillus clausii* y presencia de hifa de *C. albicans*.

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

Grupo 4A *Bacillus clausii* vegetativo con *Candida albicans* 6 días.

En este grupo se observó la formación de un Biofilm maduro multicapas, con presencia de bacilos y situado en poca cantidad *Candida albicans* (Fig.46).

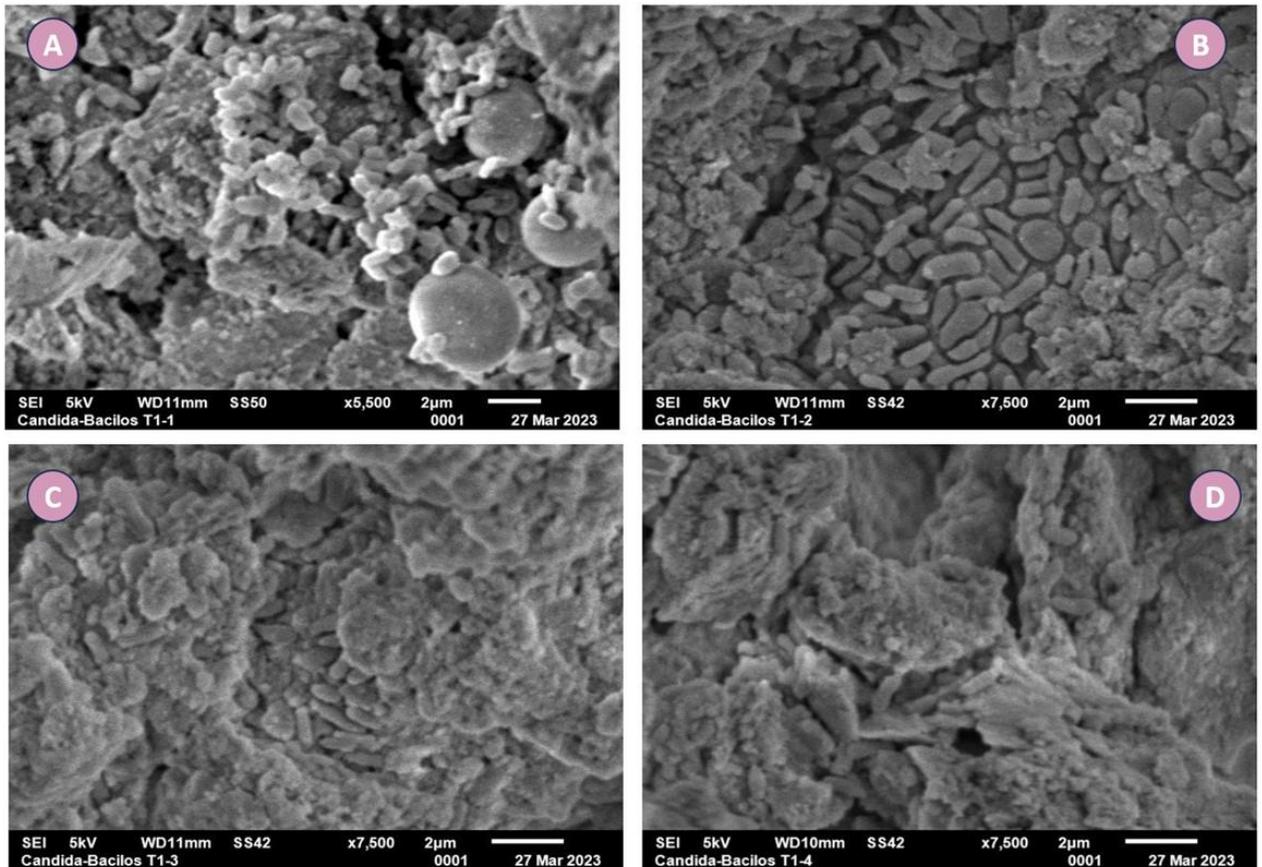


Fig. 46 Grupo 4A En Micrografía (A) Bacilos de *B. clausii* rodeando a *C. albicans*. En (B) Biofilm con presencia de bacilos. (C) y (D) Biofilm maduro.

Grupo 4B *B. clausii* vegetativo con *Candida albicans* 20 días.

En este grupo se observaron en las micrografías *C. albicans* integras, esporas y también formas bacilares. En dos de las micrografías se notó a *Candida albicans* con pérdida de estructura y en poca cantidad (Fig. 47).

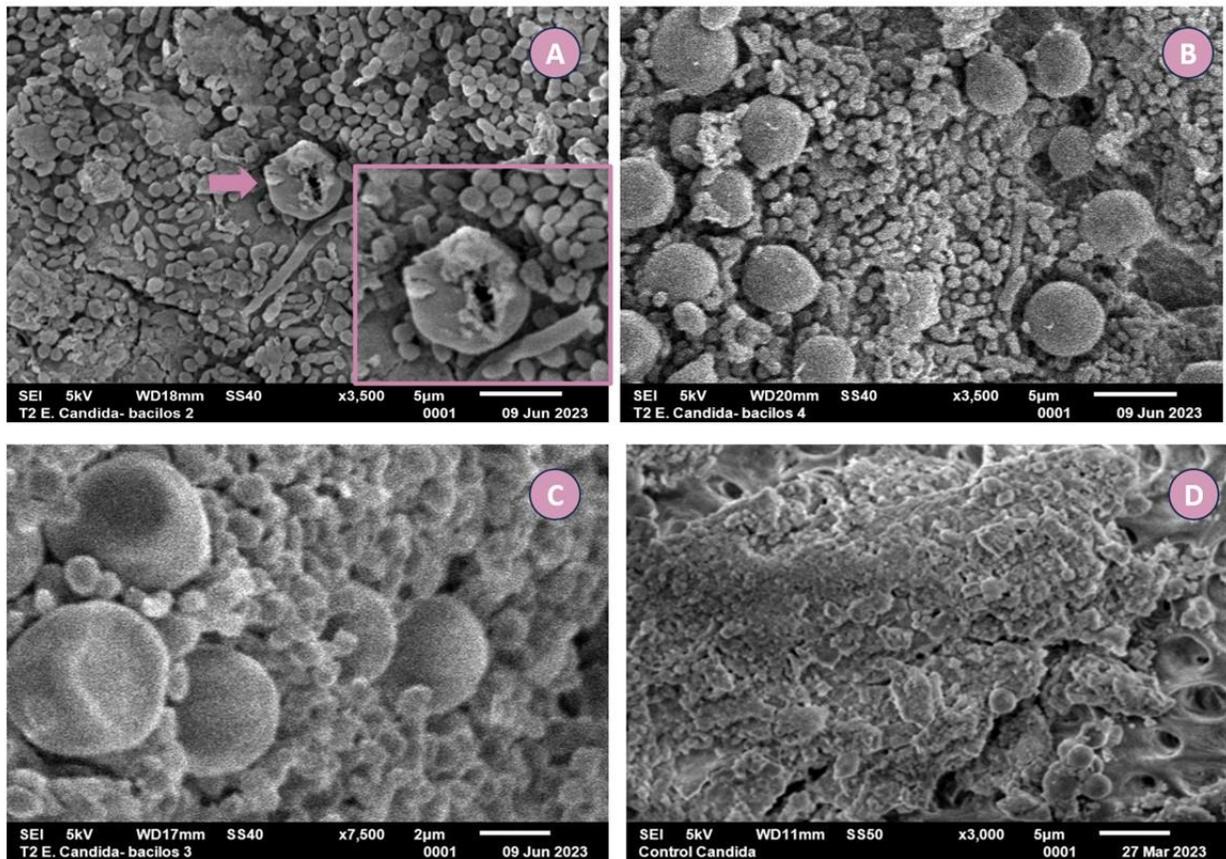


Fig. 47 Grupo 4B. (A) Colonización de esporas y bacilos. En aumento *C. albicans* con pérdida de estructura y pared celular discontinua. (B) *C. albicans* integras junto a bacilos. (C) Colonización de esporas y *C. albicans* con inicio de daño estructural. (D) Biofilm maduro.

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

Asociación entre forma de *Bacillus clausii* y presencia de *Enterococcus faecalis*.

Un evaluador calibrado realizó la evaluación semicuantitativa mediante un sistema de cuatro puntuaciones para imágenes obtenidas por MEB(100,101):

Tabla 6. Escala de puntuación para imágenes de MEB

Puntuación	
1	Menos del 5% de cobertura de biofilm en la pared.
2	Cobertura del 5-33% de la pared del conducto.
3	Cobertura del Biofilm entre 34 y 66%
4	Cobertura del Biofilm del 67-100%

Obteniendo los siguientes valores:

Tabla 7. Puntajes Obtenidos en los grupos de *Enterococcus faecalis* con *Bacillus clausii* de forma vegetativa y esporulada.

	< 5%	5-33%	34-66%	67-100%
1A <i>B. clausii</i> esporas- <i>E. faecalis</i> 6 días	6	3	1	0
1B <i>B. clausii</i> esporas- <i>E. faecalis</i> 20 días	4	4	1	1
2A <i>B. clausii</i> bacilos- <i>E. faecalis</i> 6 días	3	3	3	1
2B <i>B. clausii</i> bacilos- <i>E. faecalis</i> 20 días	1	4	4	1
Control <i>E. faecalis</i>	0	0	0	10
Control negativo	10	0	0	0

Con los datos anteriores se realizó la prueba chi-cuadrado y V de Cramér, obteniendo los siguientes resultados:

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

Tabla. 8 prueba chi-cuadrado para resultados de Grupos de *Enterococcus faecalis* y *Bacillus clausii* de forma vegetativa y esporulada.

Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	gl	Valor de p
Chi-cuadrado de Pearson	11.365	3	.010
Nivel de significancia $p \leq 0.05$			

Tabla. 9 nivel de asociación entre variables

Medidas simétricas			
		Valor	Significación aproximada
Nominal por Nominal	V de Cramer	.377	.010

Existe asociación entre variables forma de *B. clausii* y el porcentaje de presencia de *E. faecalis*, con un nivel de asociación moderado.

Asociación entre tiempo de contacto en días y presencia de *Enterococcus faecalis*

Tabla. 10 Prueba chi- cuadrado para evaluar asociación en el tiempo de contacto y la presencia de *E. faecalis*.

Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	gl	Valor de p
Chi-cuadrado de Pearson	3.746 ^a	3	.290
Nivel de significancia $p \leq 0.05$			

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

Medidas simétricas			
		Valor	Significación aproximada
Nominal por Nominal	V de Cramer	.216	.290

No existe asociación entre variables tiempo y presencia en porcentaje de *E. faecalis*, con asociación moderada.

Asociación entre forma de *Bacillus clausii* y presencia de *Candida albicans*.

Tabla 11. Puntaje para los grupos con *Candida albicans* y *Bacillus clausii* en forma vegetativa y esporulada.

	< 5%	5-33%	34-66%	67-100%
3A <i>B. clausii</i> esporas- <i>C. albicans</i> 6 días	8	2	0	0
3B - <i>B. clausii</i> esporas- <i>C. albicans</i> 20 días	4	6	0	0
4A <i>B. clausii</i> vegetativo- <i>C. albicans</i> 6 días	9	2	0	0
4B <i>B. clausii</i> vegetativo- <i>C. albicans</i> 20 días	6	4	0	0
Control <i>C. albicans</i>	0	0	0	10
Control negativo	10	0	0	0

Tabla. 12 Pruebas de chi-cuadrado para evaluar asociación entre dos variables.

Pruebas de chi-cuadrado				
	Valor	gl	Valor de p	
Chi-cuadrado de Pearson	2.051	1	.152	
Nivel de significancia $p \leq 0.05$				

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

Tabla. 13 Nivel de asociación entre dos variables

Medidas simétricas			
		Valor	Significación aproximada
Nominal por Nominal	V de Cramer	.160	.152

No existe asociación entre variables Forma de *B. clausii* y presencia de *C. Albicans*, con asociación débil.

Asociación entre tiempo de contacto en días y presencia de *Candida albicans*.

Tabla. 14 Prueba chi-cuadrado para asociación entre variables tiempo y presencia del microorganismo,

Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	gl	Valor de p
Chi-cuadrado de Pearson	11.1681	a	<.001
Nivel de significancia p ≤ 0.05			

Medidas simétricas			
		Valor	Significación aproximada
Nominal por Nominal	V de Cramer	.374	<.001

Existe asociación entre variables tiempo y presencia de *C. albicans*, con asociación

7.0 Discusión

El desempeño de cualquier microorganismo probiótico en la salud humana depende de múltiples factores como son su pureza, la concentración, su estado de conservación y la forma de aplicación, en este estudio se decidió obtener el probiótico *B. clausii* en esporas a partir de la presentación comercial Enterogermina®. La concentración mínima aceptada para que un probiótico ejerza una actividad benéfica en el huésped es de al menos 1×10^9 UFC/mL(103), en este sentido Enterogermina® cumple con el parámetro al tener una concentración de 2×10^9 UFC/mL, para corroborar su pureza se realizó tinción de Gram de la suspensión de esporas, se logró observar microscópicamente la presencia de estructuras circulares bien definidas sin división celular, estos datos concuerdan con los reportados por Vecchione y cols., 2018, Ghelardi y cols., 2023 quienes mediante técnicas de identificación bioquímica y molecular comprobaron que Enterogermina® cumple con las especificaciones del fabricante y es una fuente de alta calidad de *Bacillus clausii*(104,105).

Para poder evaluar los efectos benéficos de *B. clausii* es importante realizarlo en sus dos morfologías, tanto en espora como en bacilo, para lograr la germinación exitosa de una espora se han propuesto diferentes metodologías desde el empleo de medios de cultivo específicos o la suplementación de estos con agentes estimulantes de esporulación, la agitación constante, la centrifugación, el shock térmico entre otros(102,106,107). En esta investigación se decidió seguir la metodología reportada por Ripert y cols.,2016(102) modificado para los objetivos de este estudio, una de las modificaciones fue el utilizar un medio de cultivo específico para los microorganismos estudiados y disminuir el tiempo de germinación de 72 a 24 horas, manteniendo agitación y temperatura constantes, basado en esta técnica se obtuvieron células vegetativas observando que a una mayor concentración había mayor actividad y desarrollo celular, que al ponerlo en contacto con los microorganismos de estudio (*E. faecalis* y *C. albicans*) en forma planctónica la forma vegetativa de *B. clausii* mostró una buena actividad, llama la atención es que es necesaria una concentración alta de *Bacillus clausii* con una concentración baja de *E. faecalis* para lograr el equilibrio de

los dos microorganismos, llegando a estos resultados posterior a realizar pruebas en diferentes concentraciones de ambos .

Uno de los mecanismos de acción de *B. clausii* es la acidificación del medio al aumentar el pH del ambiente(95), *E. faecalis* es uno de los microorganismos más resistentes a condiciones desfavorables tiene la capacidad de mantener en homeostasis el pH mediante su bomba de protones, lo que le permite, sobrevivir y adaptarse a un medio ácido, como el provocado por los bacilos, además compite con otras células, tiene la capacidad de adherirse y secretar endotoxinas lo que le da ventajas de competencia frente a cualquier microorganismo(29,30,33), estas características explican su comportamiento observado al contacto con *B. clausii*. Lo contrario se observó a 24 horas del contacto entre *C. albicans* y *B. clausii* a las mismas concentraciones, hubo un equilibrio entre los dos microorganismos y en algunas zonas se observaron células bacilares que atacan a *C. albicans*, de acuerdo Bermudez y cols., 2012; Raheem y cols., 2021 los probióticos atacan a otros microorganismos mediante la competencia por los nutrientes en el medio, la secreción de ácidos o bacteriocinas que son capaces de producir daño en la estructura de otro microorganismo y excluir su presencia en el medio(63,80).

En ocasiones el comportamiento observado por los microorganismos en estado planctónico puede estar alejado de lo que sucede en la realidad, ya que difícilmente los microorganismos patógenos se encuentran en este estado, generalmente se encuentran agrupados en forma de biofilm(44). La capacidad de antagonismo o sinergismo de dos microorganismos en biofilm depende de sus características individuales, de su capacidad de adhesión, de colonización, de los factores de virulencia, del medio, de la cantidad y calidad de los nutrientes disponibles y del tipo de sustrato en el que se desarrollan(4,12,46,49,50). La microscopia electrónica de barrido permite tener un acercamiento más fidedigno de las interacciones que pueden ocurrir en un biofilm de diferentes microorganismos, nos da un panorama general de la forma de agrupamiento, la exclusión competitiva y la capacidad de colonización de estos(46,108).

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

En este estudio se propuso corroborar si los patrones observados en los microorganismos en forma planctónico se reproducían al formar un biofilm con probiótico en forma de esporas y vegetativo con *E. faecalis* y *C. albicans* por separado a dos periodos de tiempo evaluándose mediante microscopía electrónica de barrido, utilizando raíces dentales humanas extraídas estandarizadas. En los controles positivos se observó un biofilm tanto de *E. faecalis* como de *C. albicans* solido que sirvieron de referencia para llevar a cabo un análisis estadístico de las micrografías. Contrario a los controles negativos donde se aprecia completa permeabilidad de los túbulos dentinarios. Los tiempos de los grupos de estudio fueron a 6 y 20 días con el fin de analizar su comportamiento para tener una referencia en diferentes periodos de sobre *E. faecalis* y *C. albicans*.

De acuerdo a los resultados de los grupos 1A (*Esporas de B. clausii* con *E. faecalis* 6 días) y 1B (*Esporas de B. clausii* con *E. faecalis* 20 días). A los 6 días en el grupo 1A no se observó en ninguna muestra un biofilm sólido y se aprecia el equilibrio tanto de *B. clausii* en esporas como de *E. faecalis*. Se identificaron esporas de forma circular definida y de un tamaño promedio de 0.5 μm , los reportes en la literatura respecto a la morfología de esporas de *B. clausii* son escasos, sin embargo, existen registros de esporas en otras especies de *Bacillus*. Lv y cols.(109) describen las características de esporas de *B. cereus* vistas en MEB como una estructura oval, con poros intactos y con pliegues en su superficie(109), Doona y cols.(110), describen las esporas de *Bacillus amyloliquefaciens* como estructuras cilíndricas con relieve de aproximadamente 1 μm de diámetro(110). Som y cols(111). por su parte describen las esporas de *Bacillus licheniformis* de un tamaño de 1.2 a 1.5 μm en longitud y 0.72 a 0.82 μm de ancho(111) coincidiendo con lo observado en este estudio. Cliff y cols.(112) reportaron que las esporas de *Bacillus subtilis* pueden variar en su morfología dependiendo el medio de cultivo en el que se desarrollen(112), en este estudio no se observó una diferencia substancial entre las esporas en los diferentes medios de cultivo.

En los resultados de los grupos 1B (*Esporas B. clausii* + *Enterococcus faecalis* 20 días) se observó un patrón similar a lo observado a los 6 días, pero a diferencia del grupo

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

anterior en este si se observa un biofilm maduro en capas, pero con zonas con esporas que interrumpen la formación homogénea y sólida de un biofilm de *E. faecalis*. Esta disposición puede interpretarse como un mecanismo de competencia de espacio, las bacterias patógenas y las benéficas compiten por sitios de receptores que comparten, además ambas tienen la capacidad de adherirse a la matriz extracelular y formar comunidades independientes en el mismo sustrato(63,80).

En los grupos 2A y 2B se pusieron en contacto bacilos de *B. clausii* con *E. faecalis* por 6 y 20 días. A los 6 días se observaron algunas formas bacilares en el centro del campo, pero alrededor de ellos *E. faecalis*, en este grupo si se observó un biofilm maduro. Durante la exclusión competitiva los microorganismos disminuyen el pH del medio y secretan péptidos antimicrobianos con el objetivo de obtener mayor espacio para su crecimiento y eliminar a su competencia de nutrientes(80). Al estar *B. clausii* en forma vegetativa se vuelve más lábil a todos los mecanismos de exclusión competitiva de *E. faecalis*, ocasionando que sea excluido del sustrato, y permita el crecimiento del microorganismo patógeno. Siguiendo este patrón observado en el primer tiempo a los 20 días se observa un biofilm maduro de *E. faecalis* cubriendo la mayor parte de la superficie.

Con respecto a lo encontrado con *C. albicans* en los grupos 3A y 3B(*B. clausii* esporas con *Candida albicans* 6 días y *B. clausii* esporas con *Candida albicans* 20 días), se observó un daño a la pared celular de *C. albicans* con pérdida de estructura, de acuerdo con Raheem y cols.(80) cuando los probióticos secretan péptidos antimicrobianos, estos actúan sobre la membrana, creando poros y permitiendo la salida del material celular, ocasionando la pérdida de estructura observada en las micrografías. También se observó una exclusión de *C. albicans* con una colonización predominante de bacilos.

En los resultados los grupos 4A y 4B (*B. clausii* vegetativo con *Candida albicans* 6 días y *B. clausii* vegetativo con *Candida albicans* 20 días) se observó un biofilm maduro con presencia de bacilos, de igual manera se repite patrón de pérdida de estructura de *C. albicans* y presencia de algunas esporas. El presente estudio coincidió con datos antes

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

reportados sobre el mecanismo de acción de los probióticos, así como el proceso de germinación y esporulación de *B. clausii*.

8. CONCLUSIONES

- *B. clausii* en forma de spora o vegetativa no ejerce una acción de competencia en biofilm de *E. faecalis*
- *B. clausii* en forma de spora y vegetativa daña la pared celular de *C. albicans* ocasionándole pérdida de estructura.
- *B. clausii* en forma esporulada y vegetativa tienen una mayor acción sobre *C. albicans* que sobre *E. faecalis*.

9. PERSPECTIVAS

- Evaluar los péptidos antimicrobianos excretados por *B. clausii*.
- Evaluar resistencia antibacteriana y síntesis de toxinas de *B. clausii*
- Evaluar el mecanismo de exclusión de *E. faecalis* contra *B. clausii*

10.0 REFERENCIAS

1. Kumar G, Tewari S, Tagg J, Chikindas ML, Popov I V., Tiwari SK. Can Probiotics Emerge as Effective Therapeutic Agents in Apical Periodontitis? A Review., Probiotics and Antimicrobial Proteins.2021: 299–314.
2. Bohora A, Kokate S, Khedkar S, Vankudre A. Antimicrobial activity of probiotics against endodontic pathogens: A preliminary study. Indian J Med Microbiol. 2019;37(1):5–11.
3. Fouad AF. Endodontic microbiology. 2a Ed. Elsevier. North Carolina,USA. 2017
4. Siqueira JF, Rôças IN. Treatment of endodontic infections. 2a ed. Quintessence. Alemania. 2022
5. Kakehashi R, Syanley IR, Pitzgerabd RJ, Bethesda X. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral surgery, oral medicine, and oral pathology. 1965;20: 340-349.
6. Möller AJR, Fabricius L, Dahlén G, Ohman And AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. Scandinavian journal of dental research. 1981; 89(6):475-484.
7. Smith CS, Setchell DJ, Harty FJ. Factors influencing the success of conventional root canal therapy-a five-year retrospective study. International endodontic journal. 1993; 26(6):321-333.
8. Ricucci D, Russo J, Rutberg M, Burleson JA, Spngberg LSW. A prospective cohort study of endodontic treatments of 1,369 root canals: Results after 5 years. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology. 2011;112(6):825–42.
9. Sjogren U, Hagglund, B, Sundqvist G, Wing K. Factors Affecting the Long-term Results of Endodontic Treatment.Journal of endodontics. 1990; 16(10): 498-504.
10. Swartz DB, Skidmore AE, Griffin JA. Twenty Years of Endodontic Success and Failure. Journal of endodontics.1983; 9(5): 198-202.
11. Holland R, Gomes Filho JE, Cintra LTA, Queiroz IODA, Estrela C. Factors affecting the periapical healing process of endodontically treated teeth, Journal of Applied Oral Science; 2017; 25:465–76.

12. Gomes BPFA, Berber VB, Kokaras AS, Chen T, Paster BJ. Microbiomes of Endodontic-Periodontal Lesions before and after Chemomechanical Preparation. *J Endod.* 2015;41(12):1975–84.
13. Sun X, Yang Z, Nie Y, Hou B. Microbial Communities in the Extraradicular and Intraradicular Infections Associated With Persistent Apical Periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 12;11.
14. Gomes BPFA, Francisco PA, Godoi EP, Endo MS, Barbosa-Ribeiro M, Delboni MG, et al. Identification of Culturable and Nonculturable Microorganisms, Lipopolysaccharides, and Lipoteichoic Acids From Root Canals of Teeth With Endodontic Failure. *J Endod.* 2021 1;47(7):1075–86.
15. Oliveira Santos-Junior A, De Castro Pinto L, Francisco Mateo-Castillo J, Ramos Pinheiro C. Success or failure of endodontic treatments: A retrospective study. *Journal of conservative dentistry;* 22(2): 129-132.
16. Zargar N, Amin Marashi M, Ashraf H, Hakopian R, Beigi P. Identification of microorganisms in persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings: bacterial culture and molecular detection. *Iran J Microbiol.*2019;11(2):120-128.
17. Pereira RS, Rodrigues VAA, Furtado WT, Gueiros S, Pereira GS, Avila-Campos MJ. Microbial analysis of root canal and periradicular lesion associated to teeth with endodontic failure. *Anaerobe.* 2017;1;48:12–8.
18. Dioguardi M, Di Gioia G, Illuzzi G, Arena C, Caponio VCA, Caloro GA, et al. Inspection of the microbiota in endodontic lesions., *Dentistry Journal.* 2019; 7(2):47
19. Siqueira JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97(1):85–94.
20. Kaufman Blythe, Spångberg L, Barry Jody, Fouad AF. *Enterococcus* Spp. in Endodontically Treated Teeth with and without Periradicular Lesions rights and content. *J Endod.* 2005;31:851–6.
21. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol.* 2003 ;18(2):100–3.
22. Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Endod.* 2006;32(3):173–7.

23. Endo MS, Ferraz CCR, Zaia AA, Almeida JFA, Gomes BPFA. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. *Eur J Dent.* 2013;7(3):302–9.
24. Henriques LCF, de Brito LCN, Tavares WLF, Teles RP, Vieira LQ, Teles FR, et al. Microbial Ecosystem Analysis in Root Canal Infections Refractory to Endodontic Treatment. *J Endod.* 2016;42(8):1239–45.
25. Rôças IN, Siqueira JF. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. *J Clin Microbiol.* 2012;50(5):1721–4.
26. Schirrmeyer JF, Liebenow AL, Pelz K, Wittmer A, Serr A, Hellwig E, et al. New Bacterial Compositions in Root-filled Teeth with Periradicular Lesions. *J Endod.* 2009;35(2):169–74.
27. Siqueira JF, Antunes HS, Rôças IN, Rachid CTCC, Alves FRF. Microbiome in the apical root canal system of teeth with post-treatment apical periodontitis. *PLoS One.* 2016 Sep 1;11(9).
28. Narayanan LI, Vaishnavi C. Endodontic microbiology. *Journal of Conservative Dentistry.* 2010;13(4):233.
29. Love RM. *Enterococcus faecalis*-a mechanism for its role in endodontic failure. *International Endodontic Journal.* 2001; 34(5):399-405.
30. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of Endodontics.* 2006; 32: 93–8.
31. Del Fabbro M, Samaranayake LP, Lolato A, Weinstein T, Taschieri S. Analysis of the secondary endodontic lesions focusing on the extraradicular microorganisms: an overview. *Journal of investigative and clinical dentistry.* 2014; 5: 245–54.
32. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to endodontic disease, *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine.* 2004; 15:308–20.
33. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor & D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide, *International Endodontic Journal.* 2002; 35(3): 221-228,
34. Siqueira JF, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97(5):632–41.
35. Waltimo TMT, Haapasalo M, Zehnder M, JuJ, Meyer J. Clinical aspects related to endodontic yeast infections. 2005
36. Siqueira JF, Rôças IN, Lopes P, Elias CN, De Uzeda M. Fungal Infection of the Radicular Dentin. 2002.

37. Kinirons M. J. Increased salivary buffering in association with a low caries experience in children suffering from cystic fibrosis. *Journal of dental research*. 1983;62(7): 815–817.
38. Alberti A, Corbella S, Taschieri S, Francetti L, Fakhruddin KS, Samaranayake LP. Fungal species in endodontic infections: A systematic review and meta-analysis, *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2021:16.
39. Persoon IF, Crielaard W, Özok AR. Prevalence and nature of fungi in root canal infections: a systematic review and meta-analysis, *International Endodontic Journal*. Blackwell Publishing Ltd; 2017. 50: 1055–66.
40. Ashraf H, Samiee M, Eslami G, Reza M, Hosseini G. Presence of *Candida Albicans* in Root Canal System of Teeth Requiring Endodontic Retreatment with and without Periapical Lesions., *IEJ*. 2007; 2.
41. Kumar J, Sharma R, Sharma M, Prabhavathi V, Paul J, Deepak Chowdary C. Presence of *Candida albicans* in root canals of teeth ... Kumar J et al Original Research Presence of *Candida albicans* in Root Canals of Teeth with Apical Periodontitis and Evaluation of their Possible Role in Failure of Endodontic Treatment. *Journal of International Oral Health*. 2015:7.
42. Mergoni G, Percudani D, Lodi G, Bertani P, Manfredi M. Prevalence of *Candida* Species in Endodontic Infections: Systematic Review and Meta-analysis., *Journal of Endodontics*. Elsevier Inc.; 2018;44:1616-1625.e9.
43. Ortega-Peña S, Hernández-Zamora E. Microbial biofilms and their impact on medical areas: Physiopathology, diagnosis and treatment, *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. Permanyer Publications; 2018;45: 79–88.
44. Parsek MR, Singh PK. Bacterial Biofilms: An Emerging Link to Disease Pathogenesis, *Annual Review of Microbiology*. 2003; 57: 677–701.
45. Lasa I, Del Pozo JL, Penadés JR, Leiva J. Biofilms bacterianos e infección Bacterial biofilms and infection, *An. Sist. Sanit. Navar*. 2005; 28.
46. Neelakantan P, Romero M, Vera J, Daood U, Khan AU, Yan A, et al. Biofilms in Endodontics—Current status and future directions., *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2017;28.
47. Shrestha L, Fan HM, Tao HR, Huang JD. Recent Strategies to Combat Biofilms Using Antimicrobial Agents and Therapeutic Approaches, *Pathogens*. MDPI; 2022:11.
48. Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. Taylor and Francis Inc.; 2018:9: 522–54.

49. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The Exopolysaccharide Matrix: A Virulence Determinant of Cariogenic Biofilm. *J Dent Res*. 2013;92(12):1065–73.
50. De Revisión A, Zambrano MA, Londoño LS. Biofilms bacterianos: sus implicaciones en salud y enfermedad Biofilms: implications in health and disease, *Univ Odontol*. 2006;25.
51. Plakunov VK, Zhurina M V., Gannesen A V., Mart'yanov S V., Nikolaev YA. Antibiofilm Agents: Terminological Ambiguity and Strategy for Search. *Microbiology*. 2019;88(6):747–50.
52. Zhao A, Sun J, Liu Y. Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies., *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2023;13.
53. Mirghani R, Saba T, Khaliq H, Mitchell J, Do L, Chambi L, et al. Biofilms: Formation, drug resistance and alternatives to conventional approaches. *AIMS Microbiology*. AIMS Press; 2022;8:. 240–78.
54. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(8):506–14.
55. Monteagudo-Mera A, Rastall RA, Gibson GR, Charalampopoulos D, Chatzifragkou A. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer Verlag; 2019;103: 6463–72.
56. Stavropoulou E, Bezirtzoglou E. Probiotics in Medicine: A Long Debate, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2020;11.
57. Fuller R. A Review of Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 1989;66.
58. Ritchie ML, Romanuk TN. A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases. *PLoS One*. 2012;18;7(4).
59. MARTEAU P, VESA T. Pharmacokinetics of Probiotics and Biotherapeutic Agents in Humans. *Biosci Microflora*. 1998;17(1):1–6.
60. Marteau P, Shanahan F. Basic aspects and pharmacology of probiotics: An overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology*. 2003;17(5):725–40.
61. Fda. Contains Nonbinding Recommendations Draft-Not for Implementation [Internet]. Available from: <http://www.regulations.gov>.

62. Zommiti M, Feuilloley MGJ, Connil N. Update of probiotics in human world: A nonstop source of benefactions till the end of time., *Microorganisms*. MDPI AG; 2020;8: 1–33.
63. Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2012;61: 160–74.
64. Maldonado Galdeano C, Cazorla SI, Lemme Dumit JM, Vélez E, Perdigón G. Beneficial effects of probiotic consumption on the immune system. *Ann Nutr Metab*. 2019 ;74(2):115–24.
65. Azad MAK, Sarker M, Wan D. Immunomodulatory Effects of Probiotics on Cytokine Profiles, *BioMed Research International*. Hindawi Limited; 2018; 18.
66. Rogers GB, Narkewicz MR, Hoffman LR. The CF gastrointestinal microbiome: Structure and clinical impact., *Pediatric Pulmonology*. John Wiley and Sons Inc.; 2016;51: 35–44.
67. Hakansson A, Molin G. Gut microbiota and inflammation. 3, *Nutrients*. MDPI AG; 2011;3 637–87.
68. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation., *Cell*. Elsevier B.V.; 2010;140:805–20.
69. Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR. Survival of Lactic Acid Bacteria in the Human Stomach and Adhesion to Intestinal Cells. *J Dairy Sci*. 1987;70(1):1–12.
70. Zwolinska-Wcislo M, Mach T, Budak A. Probiotics and Fungal Colonization of Gastrointestinal Tract. In: *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics*. Elsevier; 2010:371–83.
71. Fukuda K. Is it feasible to control pathogen infection by competitive binding of probiotics to the host? *Virulence*. 2017;8(8):1502–5.
72. Kline KA, Fälker S, Dahlberg S, Normark S, Henriques-Normark B. Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions., *Cell Host and Microbe*. 2009;5: 580–92.
73. Glenting J, Beck HC, Vrang A, Riemann H, Ravn P, Hansen AM, et al. Anchorless surface associated glycolytic enzymes from *Lactobacillus plantarum* 299v bind to epithelial cells and extracellular matrix proteins. *Microbiol Res*. 2013;168(5):245–53.
74. Vastano V, Salzillo M, Siciliano RA, Muscariello L, Sacco M, Marasco R. The E1 beta-subunit of pyruvate dehydrogenase is surface-expressed in *Lactobacillus plantarum* and binds fibronectin. *Microbiol Res*. 2014;169(2–3):121–7.

75. Sharma K, Pooranachithra M, Balamurugan K, Goel G. Probiotic mediated colonization resistance against E.coli infection in experimentally challenged *Caenorhabditis elegans*. *Microb Pathog*. 2019;127:39–47.
76. Celebioglu HU, Olesen SV, Prehn K, Lahtinen SJ, Brix S, Abou Hachem M, et al. Mucin- and carbohydrate-stimulated adhesion and subproteome changes of the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *J Proteomics*. 2017; 63:102–10.
77. He S, Ran C, Qin C, Li S, Zhang H, De Vos WM, et al. Anti-Infective Effect of Adhesive Probiotic *Lactobacillus* in Fish is Correlated with Their Spatial Distribution in the Intestinal Tissue. *Sci Rep*. 2017;1;7(1).
78. Heeney DD, Zhai Z, Bendiks Z, Barouei J, Martinic A, Slupsky C, et al. *Lactobacillus plantarum* bacteriocin is associated with intestinal and systemic improvements in diet-induced obese mice and maintains epithelial barrier integrity in vitro. *Gut Microbes*. 2019;10(3):382–97.
79. Anderson RC, Cookson AL, McNabb WC, Park Z, McCann MJ, Kelly WJ, et al. *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiol*. 2010;10.
80. Raheem A, Liang L, Zhang G, Cui S. Modulatory Effects of Probiotics During Pathogenic Infections With Emphasis on Immune Regulation. *Frontiers in Immunology*. *Frontiers Media S.A.*; 2021;12.
81. Dimidi E, Christodoulides S, Scott SM, Whelan K. Mechanisms of action of probiotics and the gastrointestinal microbiota on gut motility and constipation. *Advances in Nutrition*. *American Society for Nutrition*; 2017;8: 484–94.
82. Baidara P, Korpole S, Grover V. Bacteriocins: perspective for the development of novel anticancer drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*. *Springer Verlag*; 2018;102:10393–408.
83. Notermans DW, Bauer P, Kuijper EJ, Van Dissel JT, Martijn D, Bauer MP, et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *The Lancet*. 2011;377:63–73.
84. Bogdan M, Gofita E, Calina DC, Turcu-Stiolica A, Docea AO, Balseanu TA, et al. New Antidepressant Medication: Benefits Versus Adverse Effects. In: *Pharmacokinetics and Adverse Effects of Drugs - Mechanisms and Risks Factors*. *InTech*; 2018;23(2).
85. Shimauchi H, Mayanagi G, Nakaya S, Minamibuchi M, Ito Y, Yamaki K, et al. Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*. 2008;35(10):897–905.

86. Nikawa H, Makihira S, Fukushima H, Nishimura H, Ozaki Y, Ishida K, et al. Lactobacillus reuteri in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. Int J Food Microbiol. 2004;95(2):219–23.
87. Hatakka K, Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Richardson M, Poussa T, Meurman JH, et al. Probiotics reduce the prevalence of oral Candida in the elderly a randomized controlled trial. J Dent Res. 2007 ;86(2):125–30.
88. Cosme-Silva L, Dal-Fabbro R, Cintra LTA, Ervolino E, Piazza F, Mogami Bomfim S, et al. Reduced bone resorption and inflammation in apical periodontitis evoked by dietary supplementation with probiotics in rats. Int Endod J. 2020;53(8):1084–92.
89. Kumar G, Tewari S, Tagg J, Chikindas ML, Popov I V., Tiwari SK. Can Probiotics Emerge as Effective Therapeutic Agents in Apical Periodontitis? A Review. Probiotics and Antimicrobial Proteins. Springer; 2021;13: 299–314.
90. Charan Teja GV, Nandana Raju MR, Neelima Reddy UL, V Satyanarayana U V, Praneeth D, Maheswari K. An In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of Probiotics Against Endodontic Pathogens. Cureus. 2022;30.
91. Lee NK, Kim WS, Paik HD. Bacillus strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. Food Sci Biotechnol. 2019;28(5):1297-1305.
92. Dharumadurai D, Alwarappan S. Advances in Probiotics. Elsevier. 1a Ed. 2021.
93. Sella SRBR, Vandenberghe LPS, Soccol CR. Life cycle and spore resistance of spore-forming Bacillus atrophaeus. Microbiol Res. 2014;169(12):931–9.
94. Khatri I, Sharma G, Subramanian S. Composite genome sequence of Bacillus clausii, a probiotic commercially available as Enterogermina®, and insights into its probiotic properties. BMC Microbiol. 2019; 30;19(1).
95. Lee NK, Kim WS, Paik HD. Bacillus strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. Food Science and Biotechnology. The Korean Society of Food Science and Technology; 2019;28:1297–305.
96. Ripert G, Racedo SM, Elie AM, Jacquot C, Bressollier P, Urdaci MC. Secreted compounds of the probiotic Bacillus clausii strain O/C inhibit the cytotoxic effects induced by Clostridium difficile and Bacillus cereus toxins. Antimicrob Agents Chemother. 2016; 60(6):3445–54.
97. Sanders ME, Morelli L, Tompkins TA. Sporeformers as Human Probiotics: Bacillus, Sporolactobacillus, and Brevibacillus. Comprehensive reviews in food science and food safety. 2003;2(3):101-110.

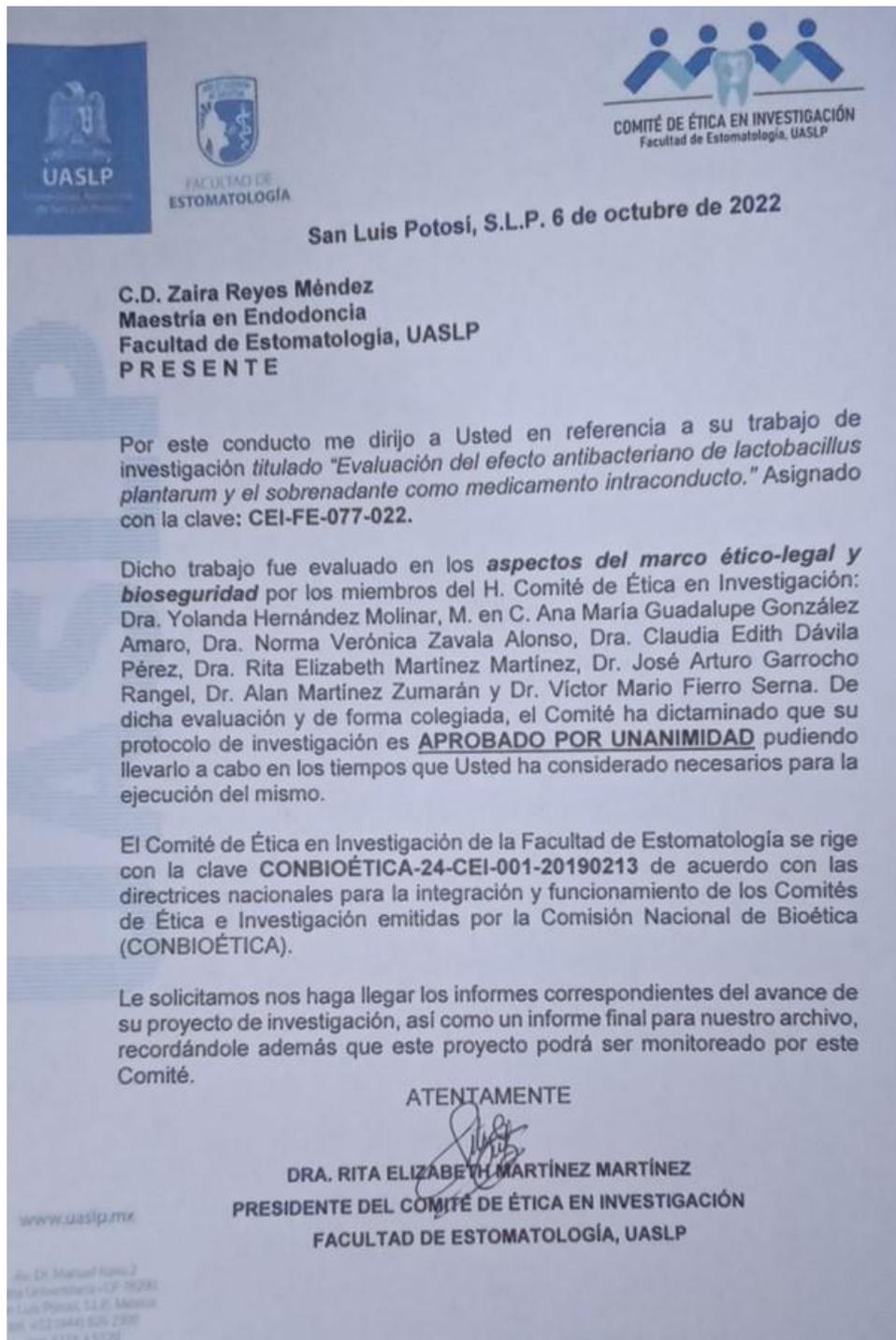
98. Rosenberg A, Sinai L, Smith Y, Ben-Yehuda S. Dynamic expression of the translational machinery during *Bacillus subtilis* life cycle at a single cell level. *PLoS One*. 2012;7(7).
99. Zhang P, Garner W, Yi X, Yu J, Li YQ, Setlow P. Factors affecting variability in time between addition of nutrient germinants and rapid dipicolinic acid release during germination of spores of *Bacillus* species. *J Bacteriol*. 2010;192(14):3608–19.
100. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Aprecio RM, Handysides R, Jaramillo DE. Biofilm removal by 6% sodium hypochlorite activated by different irrigation techniques. *Int Endod J*. 2014;47(7):659–66.
101. Bhuva B, Patel S, Wilson R, Niazi S, Beighton D, Mannocci F. The effectiveness of passive ultrasonic irrigation on intraradicular *Enterococcus faecalis* biofilms in extracted single-rooted human teeth. *Int Endod J*. 2010;43(3):241–50.
102. Ripert G, Racedo SM, Elie AM, Jacquot C, Bressollier P, Urdaci MC. Secreted compounds of the probiotic *Bacillus clausii* strain O/C inhibit the cytotoxic effects induced by *Clostridium difficile* and *Bacillus cereus* toxins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(6):3445–54.
103. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to non characterised microorganisms pursuant to Article 13mof Regulation No. 1924/2006. *EFSA Journal*. 2009;1;7(10).
104. Vecchione A, Celandroni F, Mazzantini D, Senesi S, Lupetti A, Ghelardi E. Compositional quality and potential gastrointestinal behavior of probiotic products commercialized in Italy. *Front Med (Lausanne)*. 2018;1;5.
105. Ghelardi E, Mazzantini D, Celandroni F, Calvigioni M, Panattoni A, Lupetti A, et al. Analysis of the microbial content of probiotic products commercialized worldwide and survivability in conditions mimicking the human gut environment. *Front Microbiol*. 2023;14.
106. Ahire JJ, Kashikar MS, Madempudi RS. Comparative accounts of probiotic properties of spore and vegetative cells of *Bacillus clausii* UBBC07 and in silico analysis of probiotic function. *3 Biotech*. 2021;11(3).
107. Ramirez-Peralta A, Zhang P, Li Y qing, Setlow P. Effects of sporulation conditions on the germination and germination protein levels of *Bacillus subtilis* spores. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(8):2689–97.
108. Magana M, Sereti C, Ioannidis A, Mitchell CA, Ball AR, Magiorkinis E, et al. Options and Limitations in Clinical Investigation of Bacterial Biofilms. 2018; 31(3):e00084-16.

109. Lv R, Zou M, Chantapakul T, Chen W, Muhammad AI, Zhou J, et al. Effect of ultrasonication and thermal and pressure treatments, individually and combined, on inactivation of *Bacillus cereus* spores. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103(5):2329–38.
110. Doona CJ, Feeherry FE, Kustin K, Chen H, Huang R, Philip Ye X, et al. A Quasi-chemical Model for Bacterial Spore Germination Kinetics by High Pressure. *Food Engineering Reviews*. 2017;9(3):122–42.
111. Khanal SN, Anand S, Muthukumarappan K. Evaluation of high-intensity ultrasonication for the inactivation of endospores of 3 bacillus species in nonfat milk. *J Dairy Sci*. 2014 ;1;97(10):5952–63.
112. Cliff JB, Jarman KH, Valentine NB, Golledge SL, Gaspar DJ, Wunschel DS, et al. Differentiation of spores of *Bacillus subtilis* grown in different media by elemental characterization using time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(11):6524–30.

Efecto antimicrobiano de *Bacillus clausii* en biofilm de *Enterococcus faecalis* y biofilm de *Candida albicans*.

11.0 ANEXOS

Carta de aceptación de Comité de Ética de Facultad de Estomatología, UASLP.



Logo of UASLP (Universidad Autónoma de San Luis Potosí) and Facultad de Estomatología. Logo of the Comité de Ética en Investigación, Facultad de Estomatología, UASLP.

San Luis Potosí, S.L.P. 6 de octubre de 2022

C.D. Zaira Reyes Méndez
Maestría en Endodoncia
Facultad de Estomatología, UASLP
PRESENTE

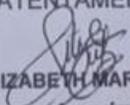
Por este conducto me dirijo a Usted en referencia a su trabajo de investigación titulado "Evaluación del efecto antibacteriano de *Lactobacillus plantarum* y el sobrenadante como medicamento intraconducto." Asignado con la clave: CEI-FE-077-022.

Dicho trabajo fue evaluado en los **aspectos del marco ético-legal y bioseguridad** por los miembros del H. Comité de Ética en Investigación: Dra. Yolanda Hernández Molinar, M. en C. Ana María Guadalupe González Amaro, Dra. Norma Verónica Zavala Alonso, Dra. Claudia Edith Dávila Pérez, Dra. Rita Elizabeth Martínez Martínez, Dr. José Arturo Garrocho Rangel, Dr. Alan Martínez Zumarán y Dr. Víctor Mario Fierro Serna. De dicha evaluación y de forma colegiada, el Comité ha dictaminado que su protocolo de investigación es **APROBADO POR UNANIMIDAD** pudiendo llevarlo a cabo en los tiempos que Usted ha considerado necesarios para la ejecución del mismo.

El Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Estomatología se rige con la clave **CONBIOÉTICA-24-CEI-001-20190213** de acuerdo con las directrices nacionales para la integración y funcionamiento de los Comités de Ética e Investigación emitidas por la Comisión Nacional de Bioética (CONBIOÉTICA).

Le solicitamos nos haga llegar los informes correspondientes del avance de su proyecto de investigación, así como un informe final para nuestro archivo, recordándole además que este proyecto podrá ser monitoreado por este Comité.

ATENTAMENTE


DRA. RITA ELIZABETH MARTÍNEZ MARTÍNEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA, UASLP

www.uaslp.mx

Av. Dr. Manuel Haimo 2
79000 San Luis Potosí, S.L.P.
Tel: +52 (444) 825 2300
Fax: +52 (444) 825 2300