

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

**ESTUDIO DE MATRIZ POLIMÉRICA EXTRACELULAR
DE BIOPELÍCULA MULTIESPECIE DE ORIGEN
ODONTOGÉNICO**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

PRESENTA

VELÁZQUEZ MORENO SELENE

DIRECTOR DE TESIS:
DR. FIDEL MARTÍNEZ GUTIÉRREZ



SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

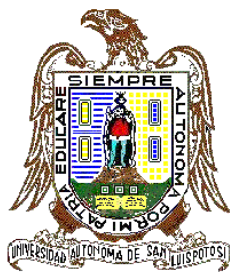
OCTUBRE, 2023

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

El programa de Doctorado en Ciencias Farmacobiológicas de la UASLP pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de Calidad (SNP) del CONAHCyT, registro 003382. Número de CVU: y registro de la beca otorgada por CONAHCyT: 816421.

Este proyecto se realizó en el “Laboratorio de Antimicrobianos, Biopelículas y Microbiota” ,y el “Laboratorio de Bioseparaciones” adscritos a la Facultad de Ciencias Químicas, el “Laboratorio de Genómica Médica” adscrito al Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, el “Laboratorio Nacional de Análisis Físicos, Químicos y Biológicos (LANAFQB)” adscrito a la Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología, el “Laboratorio Multidisciplinario de Investigación de la Maestría en Endodoncia” y el “Laboratorio de Microscopía Electrónica” adscritos a la Facultad de Estomatología, todos los anteriores pertenecientes a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Así mismo en las instalaciones del “Laboratorio de Biotecnología” adscrito al Instituto Nacional de Rehabilitación.

Dicho proyecto se llevó a cabo en el periodo comprendido entre agosto del 2019 y agosto del 2023, bajo la dirección del Dr. Fidel Martínez Gutiérrez, y fue apoyado por el Fondo de Apoyo de Investigación (FAI) de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), clave del proyecto: C18-FAI-05-40.40.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

**ESTUDIO DE MATRIZ POLIMÉRICA
EXTRACELULAR DE BIOPELÍCULA
MULTIESPECIE DE ORIGEN
ODONTOGÉNICO**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS**

PRESENTA

VELÁZQUEZ MORENO SELENE

SINODALES:

PRESIDENTE:

DR. OMAR GONZÁLEZ ORTEGA

SECRETARIO:

DR. FIDEL MARTÍNEZ GUTIÉRREZ

VOCAL:

DRA. PERLA DEL CARMEN NIÑO MORENO

VOCAL:

DRA. MILDRED QUINTANA RUÍZ

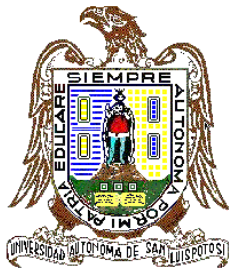
VOCAL:

DR. RICARDO OLIVA RODRÍGUEZ



SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

OCTUBRE, 2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

TITULO:

**ESTUDIO DE MATRIZ POLIMÉRICA
EXTRACELULAR DE BIOPELÍCULA
MULTIESPECIE DE ORIGEN ODONTOGÉNICO**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS**

PRESENTA

M.C. SELENE VELÁZQUEZ MORENO

COMITÉ TUTORIAL:

DR. FIDEL MARTÍNEZ GUTIÉRREZ

Director
Profesor Investigador
Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.

DR. OMAR GONZÁLEZ ORTEGA

Asesor
Profesor Investigador
Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.

DRA. PERLA DEL CARMEN NIÑO MORENO

Asesora
Profesor Investigador
Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.

DRA. MILDRED QUINTANA RUÍZ

Asesora
Profesor Investigador
Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.

DR. RICARDO OLIVA RODRÍGUEZ

Asesor externo
Profesor Investigador
Facultad de Estomatología, UASLP.



SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

OCTUBRE, 2023

REPORTE DE SIMILITUD

El presente trabajo fue sometido a análisis de similitud en la plataforma "turnitin" (<https://www.turnitin.com/es>). El informe de originalidad reportó un 5% de similitud.

ESTUDIO DE MATRIZ POLIMÉRICA EXTRACELULAR DE BIOPELÍCULA MULTIESPECIE DE ORIGEN ODONTOGÉNICO

INFORME DE ORIGINALIDAD

5%

ÍNDICE DE SIMILITUD

Activar Windows



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

**Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0
International**

ESTUDIO DE MATRIZ POLIMÉRICA
EXTRACELULAR DE BIOPELÍCULA
MULTIESPECIE DE ORIGEN
ODONTOGÉNICO © 2024 por Selene
Velázquez Moreno tiene licencia CC
BY-NC-ND 4.0. © 2 por S  

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en este trabajo de tesis está protegido por la Ley Federal de Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos.

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo, mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto o con fines de lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

A mis padres, gracias por traerme al mundo y no soltar mi mano desde el primer aliento.

Soy afortunada de contar con su amor, guía, paciencia y confianza, principalmente en estos cuatro años que cambiaron mi vida personal, académica y profesional. Si mis sueños se cumplen este día es por ustedes, espero que estén orgullosos de la persona en la que me he convertido.

A mi abuela Isabel, que todas las mujeres de tu estirpe cumplan sus sueños...

Agradecimientos

A mi Director de Tesis, Dr. Fidel Martínez. Agradezco infinitamente el apoyo, la confianza y paciencia que me ha tenido estos años. Su interés por nuestro bienestar dentro y fuera del aula marca para siempre mi vida, y espero que mis alumnos puedan llevar esa enseñanza transmitida; está de más decir que es un extraordinario docente e investigador, pero sobre todo es usted una maravillosa persona.

Al Dr. Omar González, gracias por aceptar nuevamente unirse al equipo y ser un pilar en este proceso, por estar a la orden, su increíble conocimiento y hacerme ver que la investigación no es rebuscada, nosotros la complicamos.

A la Dra. Perla Niño, por ser una inspiración desde aquel lejano 2010 que pude conocerla, gracias por aceptar ser parte de este proyecto y su apoyo, aunque las circunstancias mundiales impidieron trabajar algunos puntos que hubiéramos deseado ha sido un honor contar con usted.

A la Dra. Mildred Quintana, una mujer extraordinaria que tuve el honor de no solo conocer, sino de contar con su apoyo en este proyecto. Sus conocimientos y expertiz fueron fundamentales, y su trayectoria, toda una inspiración.

Al Dr. Ricardo Oliva, gracias por aceptar unirse a este equipo y sus valiosas aportaciones y consejos como nuestro clínico en un equipo de químicos e ingenieros. Gracias por los ánimos y la confianza a mi persona como su alumna y colega.

A las Doctoras Verónica Méndez González y Norma Verónica Zavala, por abrirme las puertas para la realización de este proyecto, sus consejos, apoyo y confianza a nivel laboral; Dr. Joazet Ojeda, Dr. Roberto Sánchez, Dr. Horacio Bach, por sus valiosas aportaciones para el desarrollo de este ejercicio de investigación.

A la Maestra Ana María González, gracias por el cariño, apoyo y confianza en estos 11 años. Por convertirse en mi mentora como química en un mundo de odontólogos, así como mi amiga.

A mis compañeros y amigos de posgrados, no solo PCFB, si no en otros posgrados de la Facultad de Ciencias Químicas, Medicina y Estomatología; porque este

trayecto es muy complejo y el entendimiento de ello nos hace sentir que alguien nos comprende, gracias por los consejos, alegrías e incluso los momentos de lágrimas; estoy muy orgullosa de ustedes y es un honor ser su colega, espero que la vida nos una en nuevos proyectos.

A mis amigos, Jaime, Fernanda, Samantha, Salvador, Aída, Mariana AV., Llilenis, Eladio, Andrea, Lalo, Nacho, Mariana T., Anita y Saraí, por estar para mí en esta locura, por las pláticas, abrazos, consejos, ánimos, tiempos de relax y una que otra cerveza... Sin ustedes esta etapa hubiera sido muy difícil, y son lo más bonito que me pudo pasar estos 4 años.

A mi familia, por ser el soporte de todo este proceso. Jaime “Chihuahua” quien se convirtió en un hermano a través de los años, un gran cómplice académica y personalmente, puedo decir ahora que mi abuelo también mató a Pancho Villa. Amir y Kelly que, aunque silenciosos me demuestran su apoyo y lo mucho que creen en mí, yo también estoy orgullosa de las personas que son hoy día... A mi sobrina, Odette, gracias por creer que tu tía sabe muchas cosas; ten por seguro que apoyare cada uno de tus sueños princesa... A Celeste, mi hermana, cómplice, colega y compañera que ha estado en los momentos más raros, lindos y difíciles; es increíble como alguien tan chiquito es enorme al momento de ser el pilar de su hermana mayor. A mis padres, porque tener una hija terca de naturaleza científica no es fácil, y lo han hecho de manera excepcional, todo ello protegiendo, amando y animando a su retoño de 32 años, que se sigue tropezando, pero la luz que reflejan ayuda siempre a encontrar el camino. Gracias a todos por creer en mí, por alentarme y darme su mano; a cada paso que doy ustedes son mi mayor inspiración.

A los que estuvieron y ya no están, a los que estuvieron y siguen aquí, a los que se sumaron y los que de prisa pasaron... Todos son parte del momento, de la meta, del sueño y, ese abrazo, esa palabra de aliento, ese hombro mojado o ese beso son los pilares que le dieron fuerza y forma.

Cada uno de ustedes me ha inspirado o me inspira a seguir en los momentos más difíciles de este proceso.

Para mí son como Van Gogh, toman puntos amarillos y los convierten en las estrellas más brillantes. Gracias por hacerme parte del firmamento...

Resumen

El estudio se centró en la formación de biopelículas utilizando microorganismos aislados de tratamientos endodónticos fallidos (*Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* y *Actinomyces israelii*) utilizando un modelo de estudio que emula las condiciones clínicas de desarrollo de biopelículas en raíces dentales, caracterización química y microbiológica de sus componentes, así como evaluación un nuevo protocolo de irrigación final para el tratamiento de dichas biopelículas.

Se utilizaron técnicas como la espectroscopia Raman y la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para identificar los componentes químicos, así como microscopía electrónica de barrido (MEB) para conocer su topografía. Se evaluó la eficacia del protocolo de irrigación en términos de desinfección de los conductos radiculares, así como la viabilidad celular en respuesta a los agentes utilizados.

Palabras clave: sustancia polimérica extracelular; biorreactor; endodoncia; tratamiento de conductos; biopelícula; *Enterococcus faecalis*; *Actinomyces israelii*; *Candida albicans*.

Abstract

The study was centered on the formation of biofilms using microorganisms isolated from failed endodontic treatments (*Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* and *Actinomyces israelii*) using a study model that emulates the clinical conditions of biofilm development in dental roots, chemical and microbiological characterization of their components, and the evaluation of a new final irrigation protocol for the treatment of endodontic biofilms.

Techniques such as Raman spectroscopy and high pressure liquid chromatography (HPLC) were used to identify the chemical components, and scanning electron microscopy (SEM) to determine their topography. The efficacy of the irrigation protocol was evaluated in terms of root canal disinfection, including the cell viability in response to the agents used.

Keywords: extracellular polymeric substance; bioreactor; endodontics; root canal treatment; biofilm; *Enterococcus faecalis*; *Actinomyces israelii*; *Candida albicans*.

Contenido

Estudio de matriz polimérica extracelular de biopelícula multiespecie de origen odontogénico.....	1
1. Introducción	1
2. Objetivo.....	1
3. Materiales y Métodos.....	1
4. Resultados	3
5. Discusión	4
6. Conclusión	5
7. Referencias.....	6
Tesis en formato tipo artículo	8
Extracellular polymeric matrix study of multi-species-biofilm obtained from odontogenic infection.....	9
Abstract	9
1. Introduction	9
2. Materials and methods.....	11
3 Results.....	14
4 Discusion	17
5 Conclusion	19
6 References	20
Apéndices.....	22
Artículos publicados	25

Estudio de matriz polimérica extracelular de biopelícula multiespecie de origen odontogénico

1. Introducción

Las biopelículas son comunidades de microorganismos adheridas a superficies que se componen de una matriz polimérica extracelular (EPS) con funciones protectoras, adhesión y resistencia. En endodoncia, las biopelículas son responsables de dañar la pulpa e infectar el conducto radicular. Patógenos como *E.faecalis*, *C albicans* y *A israelii* contribuyen al desarrollo de biopelículas complejas de alta resistencia.

El tratamiento de las infecciones endodónticas implica una serie de pasos de limpieza quimio-mecánica para eliminar los tejidos necróticos y las biopelículas, preparando la conservación del diente. El NaClO es la primera para la desinfección del diente debido a la compleja anatomía del conducto y biopelículas altamente resistentes, sin embargo, NaClO puede ser tóxico y dañino para los tejidos orales. Múltiples opciones alternas incluyen antibióticos, ácido cítrico, soluciones activadas electroquímicamente, enzimas y solución hiperosmótica que ha mostrado importantes efectos antimicrobianos.

2. Objetivo

El objetivo del trabajo fue caracterizar biopelículas, así como el estudio de la eficacia antimicrobiana de un nuevo protocolo de irrigación final sobre dichas biopelículas y su toxicidad en células humanas. Pretendiendo ofrecer una alternativa segura y eficiente a las técnicas convencionales de desinfección.

3. Materiales y Métodos

3.1 Estandarización de biopelículas

3.1.1 Preparación del inóculo

Se utilizaron cepas clínicas de *E.faecalis*, *A. israelii* y *C.albicans* aisladas de tratamientos endodónticos fallidos. Se preparó un inóculo, evaluando medios de cultivo: infusión cerebro corazón (BHI), Dextrosa Sabouraud (SD) y una mezcla.

3.1.2 Desarrollo de biopelículas en el modelo de estudio

En el estudio se seleccionaron 55 raíces de primeros molares mandibulares con criterios específicos de longitud (10 mm) y curvatura radicular (menores a 20°).

Las raíces se estandarizaron y limpiaron mediante conformación, limpieza por ultrasonido y esterilización. Las biopelículas se generaron en un reactor de flujo continuo (DFR) a condiciones de flujo continuo (0.82 L/min) y anaerobiosis.

3.2 Evaluación de la composición de la biopelícula

Se desarrollaron biopelículas durante diferentes intervalos (12, 24, 32, 48 y 60 h) y se evaluó la composición microbiológica de la biopelícula mediante conteo de unidades formadoras de colonia (UFC), la caracterización topográfica fue realizada mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Además, se empleó espectroscopía Raman para caracterizar los grupos funcionales en biopelícula y microorganismos en estado planctónico; así como análisis de carbohidratos en las biopelículas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

3.3 Evaluación del protocolo de irrigación

3.3.1 Preparación de modelos de estudio

El desarrollo se llevó a cabo como lo señalado en el punto 2.1 por 48 h.

3.3.2 Aplicación de los protocolos de irrigación final

Los protocolos de desinfección se dividieron en siete grupos, cada uno de los cuales utilizó una combinación diferente de soluciones para la irrigación. Estas soluciones incluían diferentes concentraciones de NaClO, una solución hiperosmótica (HS) y una mezcla de enzimas hidrolasas (HEM) de *Trichoderma reesei*. Las secuencias de irrigación de cada grupo fueron las siguientes:

A	Control	Sin irrigación
B	NaClO 2.25%	NaClO 2.25%, NaCl 0.85%, EDTA 17% y de NaCl 0.85%
C	NaClO 1%	NaClO 1%, NaCl 0.85%, EDTA 17% y NaCl 0.85%.
D	HS	HS y NaCl 0.85%
E	HEM 100 U/mL + 1% NaClO	HEM 100 U/mL, NaCl 0.85%, NaClO 1% y NaCl 0.85%
F	HEM 100 U/mL + HS	HEM 100 U/mL, NaCl 0.85%, HS y NaCl 0.85%
G	HEM 100 U/mL	HEM 100 U/mL y NaCl 0.85%

3.3.3 Evaluación de desinfección

Para la evaluación del recuento de UFC, se recogieron muestras de los conductos radiculares, se determinó el número de UFC y se estableció la reducción logarítmica con respecto al control. El MEB se utilizó para visualizar la eliminación de la biopelícula de los conductos.

3.3.4 Evaluación de biocompatibilidad

La viabilidad celular se evaluó mediante dos ensayos. En el ensayo vivo/muerto se utilizó calceína y homodímero de etidio (EthD-1) para evaluar la viabilidad celular tras la exposición a los protocolos de irrigación. El ensayo MTT se realizó para determinar el efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular.

4. Resultados

4.1 Estandarización de biopelículas

Se identificó que el medio de cultivo más adecuado para el crecimiento de los microorganismos estudiados fue el BHI.

4.1.2 Evaluación de la composición de la biopelícula

La composición microbiológica de la biopelícula multiespecie expuso que *E. faecalis* tuvo un desarrollo superior a los otros microorganismos. Mientras que las imágenes por MEB revelaron que *E. faecalis* se estableció primero en el conducto radicular, seguido de la presencia de levaduras después de 32 h. A las 48 h, las comunidades estaban cubiertas y secretaban EPS en la superficie microbiana, indicando una biopelícula madura.

En cuanto a la caracterización por espectroscopía Raman, las bandas con mayor intensidad correspondían a enlaces glucosídicos, β -galactosidasa, polisacáridos y DNA/RNA.

La caracterización de carbohidratos reveló la presencia de sacarosa, glucosa y manosa, tras una hidrólisis, se observó un aumento en los niveles de glucosa y manosa, sugiriendo la presencia de polisacáridos formados por estas unidades.

4.2 Evaluación del protocolo de irrigación

4.2.1 Evaluación microbiológica de desinfección

El grupo A, control, mostró un crecimiento microbiano de 5.34 Log₁₀ UFC/mL, mientras que el grupo B no mostró crecimiento microbiano, como similarmente

sucedio en los grupos C (0.01 Log₁₀ UFC/mL), E (0.02 Log₁₀ UFC/mL) y F (0.01 Log₁₀ UFC/mL). Sin embargo, los grupos D y G tuvieron un significativo desarrollo microbiano de 3.36 Log₁₀ UFC/mL y 4.87 Log₁₀ UFC/mL respectivamente.

Los grupos B, C, E y F tuvieron efectos antimicrobianos cercanos al 100%, mientras que los grupos D y G mostraron efectos antimicrobianos bajos.

Las micrografías mostraron la eficacia de los protocolos B, E y F, con una nula carga de microorganismos como el grupo control. Por otra parte, el grupo C presentaba disminución de microorganismos, aunque el grupo D mostró cocos y levaduras cubiertos por EPS, por último, el grupo G mostró microorganismos presentes en la superficie y en el interior de los túbulos.

4.2.2 Evaluación de viabilidad celular

El ensayo vivo/muerto mostró una elevada viabilidad celular en los grupos D, F y G, similar a la del grupo de control. Mientras que las células irrigadas con NaClO, solo o en combinación, presentaron una viabilidad baja. El ensayo MTT confirmó diferencias significativas entre los grupos tratados con NaClO y el grupo no irrigado.

5. Discusión

El estudio empleó un modelo de raíz dental con cepas anaerobias en reactores estandarizados, con el objetivo de reproducir condiciones que se asemejen a las condiciones clínicas. Pocos estudios han investigado las biopelículas multiespecie anaeróbicas, por lo que la composición y estructura de las biopelículas de este estudio son valiosas para futuras investigaciones.

Se identificó que *E. faecalis* es el microorganismo principal en la biopelícula. Esto podría estar relacionado con los factores de patogenicidad de *E. faecalis*, tales como la adhesina de colágeno, ya que la dentina está compuesta por agua, hidroxiapatita y colágeno tipo I.

Se ha sugerido que *E. faecalis* produce una enterocina que inhibe la formación de hifas de *C. albicans*. Esta situación podría explicar la ausencia de hifas y el desarrollo de levaduras en sitios donde *E. faecalis* tenía poco desarrollo, esto coincide con informes que describen los diferentes nichos ecológicos en el conducto radicular con evidencia de que ambas cepas cohabitan el conducto periápice.

En cuanto a la caracterización química del EPS, se reveló la presencia de β -galactosidasa, una enzima presente en *Enterococo* que cataliza la hidrólisis de galactósidos a monosacáridos. Además, se identificó la banda característica del enlace glucosídico, lo que indica la presencia importante de moléculas formadas por dos o más unidades de carbohidratos simples. El análisis de carbohidratos reveló la presencia mayoritaria de manosa y glucosa, lo que sugiere la presencia de polisacáridos formados por ambos azúcares, en su mayoría manosa. Se infiere que la unión de manosa y glucosa es un enlace β (1 $\rightarrow$ 4) (punto de acción de la enzima utilizada), lo que podría ser glucomanano, componente esencial en hongos.

Con respecto al protocolo de irrigación propuesto, se puede decir que la irrigación con NaClO, solo o combinado con la mezcla de enzimas, demostró una elevada capacidad de desinfección. Un estudio de Hoedke et al. también respaldó la eficaz acción antimicrobiana del NaClO contra las biopelículas multiespecie.

Interesantemente, la evaluación de desinfección indicó que el uso combinado de HS y HEM (grupo F) eliminó eficazmente microorganismos y barrillo dentinario, dejando una superficie limpia y túbulos permeables. La combinación de ambas soluciones indujo un efecto antimicrobiano sinérgico similar al del NaClO, ya que la disgregación de la EPS por la enzima, permitió que los microorganismos fueran expuestos en forma planctónica a HS, como lo descrito por Galdamez-Falla y cols en 2019, donde dicha solución fue efectiva eliminando a *E.faecalis* y *C.albicans*.

La evaluación de viabilidad demostró que las soluciones de NaClO son altamente tóxicas para los fibroblastos, esta toxicidad podría dañar los tejidos dentales, lo que podría conducir al fracaso de la restauración y el tratamiento. Mientras HS, HEM y el protocolo combinado HS + HEM mostraron una alta viabilidad celular, cumpliendo el requisito de preservar el órgano dental.

Las biopelículas en los conductos radiculares son difíciles de eliminar debido a su anatomía compleja. Los agentes que alteran la estructura del EPS ofrecen una solución en zonas donde la acción mecánica es limitada.

6. Conclusión

En este estudio se estimó la proporción de los tres microorganismos relacionados en los procesos infecciosos en la cavidad bucal, los cuales crecieron

en condiciones que simulaban el canal radicular, de esta biopelícula multiespecie se destacó la prevalencia de *E. faecalis*. La prevalencia de *E. faecalis* se reflejó en la composición química del EPS, donde la β -galactosidasa fue descrito. Se identificaron carbohidratos simples como constituyentes del EPS, que podrían ser parte de glucomananos provenientes de las levaduras.

Este estudio representa un paso importante hacia la comprensión de la naturaleza de las biopelículas multiespecie, lo que podría influir en la generación de nuevas técnicas de desinfección del conducto radicular, ya que se sabe que NaClO tiene un buen efecto de desinfección, sin embargo, es tóxico.

El protocolo de irrigación final con enzimas (HEM) y soluciones antimicrobianas biocompatibles (HS) propuesto mostró una eficacia de comparable a la del protocolo convencional de NaClO y EDTA.

En consecuencia, el protocolo de irrigación combinado ofrece una alternativa prometedora y segura para el tratamiento del conducto radicular. Dicha evidencia deberá ser comprobada con futuros estudios para considerar el uso en humanos.

7. Referencias

Falla, V. M. G., Amaro, A. M. G., Ortega, O. G., Cárdenas, J. M., Cantú, F. J. G., Noyola, M. V., et al. (2019). Antimicrobial effect of a hyperosmotic solution on endodontic microorganisms in planktonic state. *Investigacion Clinica*. <https://doi.org/10.22209/IC.v60n1a04>

Hedges, A. J. (2002). Estimating the precision of serial dilutions and viable bacterial counts. *International Journal of Food Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00022-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00022-3).

Velázquez-Moreno, S., González-Amaro, A. M., Aragón-Piña, A., López-López, L. I., Sánchez-Sánchez, R., Pérez-Díaz, M. A., Oliva-Rodríguez, R., Lorenzo-Leal, A. C., González-Ortega, O., Martínez-Gutierrez, F., Bach, H. (2023) Use of a Cellulase from *Trichoderma reesei* as an Adjuvant for *Enterococcus faecalis* Biofilm Disruption in Combination with Antibiotics as an Alternative Treatment in Secondary Endodontic Infection. *Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15031010>.

Wong, J., Manoil, D., Näsman, P., Belibasakis, G.N., Neelakantan, P. (2021). Microbiological Aspects of Root Canal Infections and Disinfection Strategies: An Update

Review on the Current Knowledge and Challenges. *Frontiers in Oral Health*.
<https://doi.org/10.3389/froh.2021.672887>.

Tesis en formato tipo artículo

Extracellular polymeric matrix study of multi-species-biofilm obtained from odontogenic infection.

Abstract

The study was centered on the formation of biofilms using microorganisms isolated from failed endodontic treatments (*Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* and *Actinomyces israelii*) using a study model that emulates the clinical conditions of biofilm development in dental roots, chemical and microbiological characterization of their components, and the evaluation of a new final irrigation protocol for the treatment of endodontic biofilms.

Techniques such as Raman spectroscopy and high pressure liquid chromatography (HPLC) were used to identify the chemical components, and scanning electron microscopy (SEM) to determine their topography. The efficacy of the irrigation protocol was evaluated in terms of root canal disinfection, including the cell viability in response to the agents used.

Keywords: extracellular polymeric substance; bioreactor; endodontics; root canal treatment; biofilm; *Enterococcus faecalis*; *Actinomyces israelii*; *Candida albicans*.

1. Introduction

Biofilms are surface-attached communities of microorganisms consisting of microorganisms embedded in an extracellular polymeric matrix (EPS) consisting of water and components such as carbohydrates, proteins, fatty acids, and nucleic acids. This chemical composition influences their protective function, adhesion and resistance to environmental or antimicrobial factors. There are more than 600 microbial species in the oral cavity, while up to 20 species may be present in the root canal. In endodontics, biofilms are an important cause of dental disease; a specific

group of microorganisms in planktonic form are responsible for damaging the pulp, colonizing and infecting the root canal, and forming biofilms that resist eradication. These pathogens, dominated by strict anaerobes, facultative anaerobes and yeasts such as *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* and *Actinomyces israelii*, contribute to the development of complex biofilms that are resistant to immune responses and antimicrobial agents.

The use of standardized bioreactors and anaerobic conditions makes it possible to simulate the conditions under which microorganisms form a biofilm in the root canal in terms of microbial species, nutrient medium, temperature and flow, factors that may limit the replication of clinical conditions. The importance of standardizing biofilm formation in endodontics lies in the characterization and search for treatment alternatives. The chemical composition of the EPS of multispecies biofilms in these infections could be used as a target for treatment of canals for their disintegration.

Endodontic treatment involves a series of chemomechanical cleaning steps to remove necrotic tissue and biofilm infections in preparation for tooth preservation. In this cleaning process, sodium hypochlorite (NaClO) is the dentist's irrigation solution of choice, and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) is used to remove inorganic smear layers in the final irrigation during root canal treatment. And while these solutions are highly effective in controlling intracanal infections, due to complex canal anatomy and highly resistant biofilms, it is critical to develop alternative irrigation protocols as NaClO can be toxic and harmful to oral tissues. Several options include antibiotics, citric acid, electrochemically activated solutions, enzymes such as cellulases, and hyperosmotic solutions based on sodium and potassium salts, which have shown significant antimicrobial effects against planktonic bacteria.

The objective of the work is to produce and characterize standardized biofilms generated in bioreactors to understand their composition and the relationship between microorganisms in the root canal, as well as to study the antimicrobial efficacy of a new final rinse protocol on anaerobic biofilms while ensuring low toxicity to human cells. By investigating the efficacy of this protocol, it is intended to provide

a safer and more efficient alternative to conventional root canal disinfection techniques.

2. Materials and methods

2.1 Standardization of biofilms

2.1.1 Preparation of Inoculum

Clinical strains of *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces israelii*, and *Candida albicans* isolated from patients with failed endodontic treatments and apical periodontitis were utilized for this study. The identification of strains was performed via biochemical tests and chromogenic media.

An inoculum of microorganisms was prepared in a planktonic state, with representative concentrations defined for each strain (mixed culture 1 and 2). Three different culture media were evaluated, including brain heart infusion (BHI), Sabouraud Dextrose (SD), and a BHI-SD mixture. Microbial growth was quantified using optical density and CFU counts in specific media to determine the optimal mixture of microorganisms and culture medium for development.

2.1.2 Development of biofilms in the study model

The study analyzed 61 mandibular first molar roots, chosen based on length (10 mm) and root curvature (less than 20°). The roots underwent a standardized cleaning process, including filing for shaping, ultrasonic cleaning with EDTA and NaClO solutions, and steam pressure autoclaving.

Biofilms were produced in a continuous flow reactor (DFR) that replicated clinical root canal conditions (0.82 L/min continuous flow and anaerobic conditions) flowing downward towards the apex of the roots. The three microorganisms, which were in a planktonic state, were introduced into a CDC reactor to activate the genes responsible for the formation of biofilms 24 h prior to the development of continuous flow biofilms.

2.2. Evaluation of Biofilm Composition

Twenty human dental roots were utilized as substrates and biofilms were developed for varying intervals (12, 24, 32, 48, and 60 hours). To evaluate the microbiological composition of the biofilm at different times, serial dilutions and cultures in specific media were conducted followed by a colony forming unit (CFU) count. Moreover, topographical characterization was carried out through scanning electron microscopy (SEM) on selected roots at different stages of development.

Raman spectroscopy was utilized in a HORIBA Xplora Plus equipment with a laser spot diameter of 1197.1 nm and a wavelength of 532 nm, along with a numerical aperture of 0.40/100x, to characterize the functional groups within samples of three root biofilms and the planktonic state microorganism mixture. High-performance liquid chromatography (HPLC) was also employed to analyze the carbohydrates present in seven root canal biofilms. Prior to analysis, an extraction was performed according to the method outlined in Strieth et al. 2021, the separation and identification were performed using an Aligent Technologies 1260 Infinity instrument and a BIO RAD Aminex HPX-87H column within a spectral range of 190.0 nm to 400.0 nm.

2.3 Evaluation of Irrigation Protocols

2.3.1 Study Model Preparation

Biofilm development in the root canal was carried out according to the procedure described in section 2.1 on 28 roots for 24 h.

2.3.2 Application of Final Irrigation Protocols

After the root biofilms were formed, the root canal disinfection protocols were divided into seven groups, and three biofilm-free control roots were used for each group, with each group using a different protocol.

A combination of irrigation solutions was used, consisting of varying concentrations of NaClO (1% and 2.5%), a hyperosmotic solution (HS), and a mixture of hydrolase enzymes (HEM) derived from *Trichoderma reesei*. The specifics for the irrigation sequences and volumes can be found detailed below.

The final sequences evaluated were as follows:

A	Control	No irrigation
B	NaClO 2.25%	5 mL of NaClO 2.25%, 2 mL of NaCl 0.85%, 5 mL of EDTA 17% and 2 mL of NaCl 0.85%
C	NaClO 1%	5 mL of NaClO 1%, 2 mL of NaCl 0.85%, 5 mL of EDTA 17% and 2 mL of NaCl 0.85%.
D	HS	5 mL of HS and 2 mL of NaCl 0.85%
E	HEM 100 U/mL + 1% NaClO	5 mL of HEM 100 U/mL, 2 mL of NaCl 0.85%, 5 mL of NaClO 1% and 2 mL of NaCl 0.85%
F	HEM 100 U/mL + HS	5 mL of HEM 100 U/mL, 2 mL of NaCl 0.85%, 5 mL of HS and 2mL of NaCl 0.85%
G	HEM 100 U/mL	5 mL of HEM 100 U/mL and 2 mL of NaCl 0.85%

NaCl refers to sodium chloride, EDTA stands for ethylenediaminetetraacetic acid, NaClO refers to sodium hypochlorite, HEM refers to hydrolase enzyme mixture, and HS stands for hyperosmotic solution.

2.3.3 Disinfection Evaluation

The protocols were assessed using two methods: colony forming unit (CFU) count and scanning electron microscopy (SEM) as previously described. Samples were obtained from the root canals using paper points for CFU count evaluation. Subsequently, the Milles and Misra method was employed to conduct dilutions, and the inoculated Petri dishes were cultured for 24-48 h. The CFU number was eventually calculated and compared with that of the control group. SEM was used to visualize biofilm removal from root canals in each irrigation group.

2.3.4 Biocompatibility Evaluation

Cell viability was evaluated using two assays: the live/dead assay and the MTT assay. A skin fibroblast cell line was exposed to the seven irrigation groups for a duration of 2 minutes with cell-irrigant contact. The live/dead assay was conducted using calcein and ethidium homodimer (EthD-1) to detect cell viability after exposure

to the irrigation protocols. The MTT assay was performed to determine the effect of the compounds on cell viability metabolism.A

3 Results

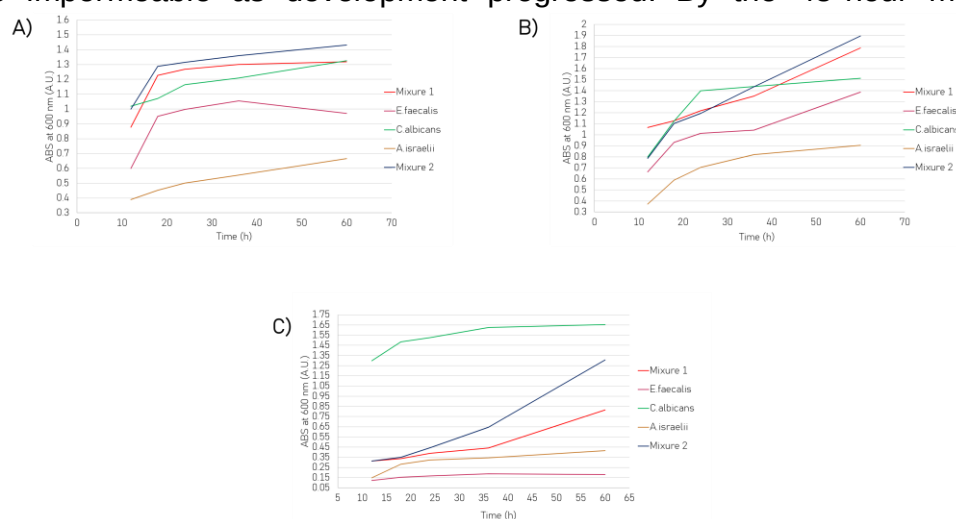
3.1 Biofilm standardization

BHI was identified as the most appropriate culture medium for growing the microorganisms under study. The mixed culture 2, composed of 15% *E. faecalis*, 50% *A. israelii*, and 35% *C. albicans*, demonstrated the highest growth rate. A 0.5 McFarland suspension was prepared by combining 150 μL of *E. faecalis* (1×10^8 CFU/mL), 500 μL of *A. israelii* (1×10^8 CFU/mL), and 350 μL of *C. albicans* (1×10^6 CFU/mL) in BHI. The mixture was agitated to turbulent flow in the CDC reactor to activate biofilm-forming genes.

3.1.2 Evaluation of biofilm composition

3.1.2.1 Microbiological composition

The microbiological composition of the multispecies biofilm produced in the root canal, as determined by CFU count, indicated that *E. faecalis* exhibited better growth than other microorganisms at all stages of biofilm development. Microscopic images obtained through SEM revealed that *E. faecalis* was present in the root canal before the appearance of yeasts at the 32-hour mark. The microbial communities were abundant and multilayered, causing the once-permeable tooth tubes to become impermeable as development progressed. By the 48-hour mark, the



communities were covered in a coating that secreted EPS on the microbial surface, signaling the presence of a mature biofilm.

3.1.2.2 Chemical Composition

In the characterization via Raman spectroscopy, the bands in the biofilms were observed to have higher intensity than in the microbial planktonic state. The identified bands were related to proteins, lipids, nucleic acids, and carbohydrates, with the bands showing higher intensity corresponding to glycosidic bonds, β -galactosidase, polysaccharides, and DNA/RNA.

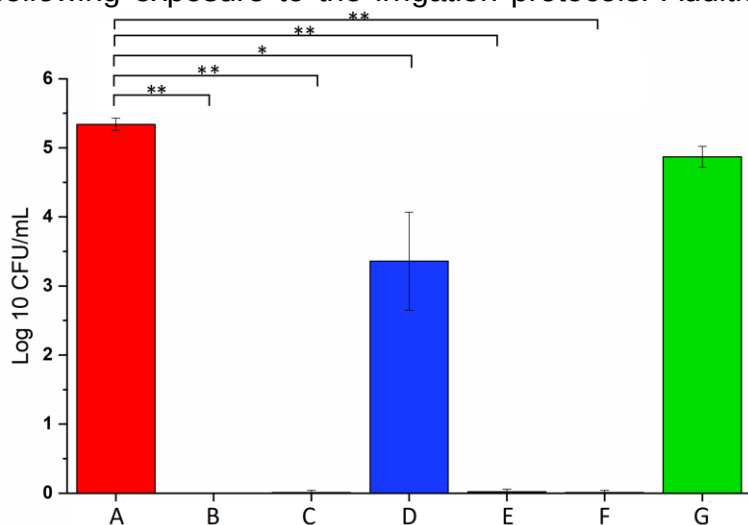
According to carbohydrate characterization by HPLC, sucrose, glucose, and mannose were present in the water-soluble fractions of EPS. After undergoing enzymatic hydrolysis, there was a rise in glucose levels, signifying the existence of compounds that resulted from the union of glucose units. In the fraction which was insoluble in water and was subjected to the hydrolytic enzyme, notable quantities of glucose and mannose were discovered, which indicates the occurrence of polysaccharides composed of these simple carbohydrate units.

3.2 Evaluation of the Irrigation Protocol

3.2.1 Microbiological Evaluation of Disinfection

3.2.1.1 Evaluation of Disinfection by CFU Count

The following observations were made after analyzing the biofilm roots following exposure to the irrigation protocols. Additionally, consistent citation and



footnote style were used. Finally, precise word choice was prioritized, and subject-specific vocabulary was utilized where applicable.

Group A (control) exhibited a microbial growth of 5.34 Log₁₀ CFU/mL.

Group B (2.25% NaClO) demonstrated no microbial growth, whereas Group C (1% NaClO) displayed a growth of 0.01 Log₁₀ CFU/mL.

Group E (EMH 100 U/mL + NaClO1%) exhibited a growth of 0.02 Log₁₀ CFU/mL. Meanwhile, Group F (EMH 100 U/mL + HS) showed low growth (0.01 Log₁₀ CFU/mL).

Group D (HS) showed a growth of 3.36 Log₁₀ CFU/mL and lastly, Group G (HEM100 U/mL) presented a significant growth of 4.87 Log₁₀ CFU/mL.

Groups B, C, E, and F exhibited almost complete antimicrobial effects, while groups D and G demonstrated low antimicrobial effects.

3.2.1.2 Evaluation of disinfection by SEM

Micrographs depicted the effectiveness of different techniques in eliminating biofilms.

The control group without intervention exhibited a biofilm-free surface, whereas the experimental group with an undisturbed biofilm (A).

Group B (2.25% NaClO) and groups E and F (with EMH) demonstrated surfaces devoid of microorganisms.

Group C (1% NaClO) displayed a reduction in microorganisms, and Group D (HS) exhibited cocci and yeasts covered by EPS, potentially indicating the existence of dead microorganisms. On the other hand, Group G (HEM100 U/mL) demonstrated microorganisms both on the surface and inside the tubules.

3.2.2 Cell viability assessment

The live/dead assay indicated high cell viability exhibited by groups D, F, and G, similar to that of the control group. In contrast, cells treated with NaClO alone or in combination showed low viability.

The MTT assay demonstrated significant distinctions between the NaClO-treated groups and the non-irrigated group.

Overall, the EMH 100 U/mL + HS combination (group F) exhibited the greatest effectiveness in removing biofilm, while the use of NaClO and EMH (group E) also

displayed remarkable antimicrobial properties. The groups given HS and HEM demonstrated limited efficacy in terms of biofilm removal. Cell viability assays confirmed the findings, demonstrating that specific procedures preserved optimal cell viability, whereas protocols utilizing NaClO exhibited detrimental effects on cell survival.

4 Discussion

In this study, a dental root model with anaerobic strains and standardized reactors was used to bridge the gap between the laboratory and the clinical setting. As few studies have explored anaerobic multispecies biofilms, this study's biofilm composition and structure are significant for future research.

E.faecalis was the predominant microbial component in the multi-species biofilm developed, followed by *C.albicans*. The affinity of *E.faecalis* for surfaces may be attributed to characteristics such as biofilm-associated pili (Ebp), aggregation substance (Agg), enterococcal surface protein (Esp), and collagen adhesin (Ace). Ace may be the most significant factor, since dentin is composed of water, hydroxyapatite, and type I collagen, which could facilitate the invasion of dentinal tubules.

It is suggested that *E.faecalis* produces Enterocin V, which inhibits the formation of *C.albicans* hyphae and alters the acidic pH produced by the enterococcus. This circumstance can clarify the absence of hyphae in the SEM images and poor yeast development. Additionally, yeast growth was found in specific areas of the root canal where *E.faecalis* exhibited minimal or no growth. This correlates with previous studies that highlight the diverse ecological niches within the root canal. Nonetheless, evidence suggests that both strains coexist within the root canal and periapical region.

In terms of the chemical characterization of the EPS created by the microorganisms, Raman spectroscopy indicated the existence of β -galactosidase, an enzyme detected in *E. faecalis* that facilitates the hydrolysis of galactosides into monosaccharides. This discovery may clarify the prevalence of the specific band and the predominance of enterococci within the biofilm. The identified characteristic glycosidic linkage band suggests a significant presence of molecules comprising two

or more single carbohydrate units. These units represent the major EPS component. Majority of glucose and mannose were discovered via HPLC analysis of the carbohydrate-containing samples, particularly after glycosidic bond hydrolysis in the non-water-soluble fraction. Thus, the presence of polysaccharides formed by both sugars, particularly mannose, is suggested. It is inferred that the enzyme used targets the β - (1 $\rightarrow$ 4) bond linkage between mannose and glucose. Glucomannan, an essential component of fungi like *C. albicans*, could potentially be present in the biofilm formed.

Properly speaking of the proposed irrigation protocol and its comparative disinfection efficacy, irrigation with NaClO alone or in combination with the enzyme mixture exhibited a high disinfection capacity based on CFU count and micrographic analysis. A study conducted by Hoedke et al. also lends support to the effective antimicrobial action of NaClO against multispecies biofilms.

The micrographs reveal that Group F, which utilized a combination of hyperosmotic solution (HS) and hydrolase enzyme mixture (HEM), effectively eliminated microorganisms and the smear layer, resulting in a clean surface and permeable tubules as efficiently as the NaClO protocols. Furthermore, Group F (HS + HEM) demonstrated superior antimicrobial efficacy in comparison to independent use of HS and HEM. HS effectively eradicated the microorganisms, however, it did not eliminate the biofilm from the surface. Conversely, HEM disintegrated the EPS, liberating live cells. The combination of both solutions produced a synergistic antimicrobial effect similar to NaClO, as the enzyme disintegrates the extracellular polymeric substance, releasing microorganisms and exposing them in their planktonic form to antimicrobial substances such as HS. Galdámez-Falla et al. (2019) reported that this solution effectively killed *E. faecalis* and *C. albicans* from endodontic infections after exposure to the antimicrobial in its planktonic form.

Viability assessments indicate that even at low concentrations and short exposure times, NaClO solutions can be highly toxic to human fibroblasts, potentially damaging dental tissues and affecting their structure and elasticity. This could result in restoration and treatment failure.

On the other hand, HS, HEM, and the combined HS + HEM protocol demonstrated high cell viability levels, meeting the criteria for safe preservation of the dental organ. The use of both HS and HEM resulted in sufficient surface cleanliness, which is a crucial aspect of an ideal irrigant as per Zehnder (2006).

Biofilms in root canals pose a challenge to eliminate due to their intricate anatomy. Modifying the EPS structure of agents can provide a solution in scenarios where mechanical action is restricted. Ultrasonic irrigation is a promising approach, capable of penetrating difficult-to-reach areas and enhancing disinfection.

5 Conclusion

In this study, a multispecies biofilm composed of three representative microorganisms of dental origin was developed. The proportion and distribution of the microorganisms was estimated under standardized conditions simulating the root canal. The prevalence of *E. faecalis* as a microbiological component over *C. albicans* and *A. israelii* was favored in the apical third of the root canal at 48 h. Analysis of the micrographs revealed a significant amount of *C. albicans* and an increase of *A. israelii* in areas of the root canal with little enterococci development after 40 h. In addition, the prevalence of *E. faecalis* was reflected in the chemical composition of the EPS, where β -galactosidase is an important metabolic component for the survival of this microorganism. Simple carbohydrates (mannose and glucose) were identified as constituents of EPS, which could be part of glucomannans of the yeasts used in the study.

Although there are still unknown factors in the characterization of a multispecies biofilm, this study represents an important step towards understanding its nature, which could influence the generation of new root canal disinfection techniques in endodontic pathologies. This will lead to research on new alternatives to the high concentrations of NaOCl used in root canal treatment.

The evaluation of a final irrigation protocol with biocompatible enzymes (HEM) and antimicrobial solutions (HS) was carried out in clinically relevant study models such as the root canal of human first molars. These models were intended to simulate biofilm development conditions, using human roots, anaerobic

environments and multiple microbial species. The proposed protocol showed a cleaning and disinfection efficacy comparable to that of the conventional NaClO and EDTA protocol.

Importantly, the proposed protocol showed lower cytotoxicity to cells compared to 2 min exposure of cells to NaClO in different protocols. Consequently, the combined EMH and HS irrigation protocol offers a promising and safe alternative for root canal treatment, demonstrating efficacy in cleaning, disinfection and cell viability.

It is of great importance to underline the importance of finding new antimicrobial agents and irrigation protocols in the field of endodontics due to the complexity of infection-causing biofilms and to favor a fully effective therapy in favor of the patient. Further investigations with different microbial species are suggested as a possible next step to broaden the understanding of the applicability of the protocol.

6 References

Cheah, Y. T., & Chan, D. J. C. (2022). A methodological review on the characterization of microalgal biofilm and its extracellular polymeric substances. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/jam.15455>.

Falla, V. M. G., Amaro, A. M. G, Ortega, O. G., Cárdenas, J. M., Cantú, F. J. G., Noyola, M. V., et al. (2019). Antimicrobial effect of a hyperosmotic solution on endodontic microorganisms in planktonic state. *Investigacion Clinica*. <https://doi.org/10.22209/IC.v60n1a04>

Goeres, D. M., Hamilton, M. A., Beck, N. A., Buckingham-Meyer, K., Hilyard, J. D., Loetterle, L. R., Lorenz. L. A., Walker, D. K., Stewart, P. S. (2009). A method for growing a biofilm under low shear at the air-liquid interface using the drip flow biofilm reactor. *Nature Protocols*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.59>.

Gonzalez, A. M., Corpus, E., Pozos-Guillen, A., Silva-Herzog, D., Aragon-Piña, A., & Cohenca, N. (2014). Continuous drip flow system to develop biofilm of *E. faecalis* under anaerobic conditions. *Scientific World Journal*. <https://doi.org/10.1155/2014/706189>

Hedges, A. J. (2002). Estimating the precision of serial dilutions and viable bacterial counts. *International Journal of Food Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00022-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00022-3).

Ordinola-Zapata, R., Bramante, C. M., Aprecio, R. M., Handysides, R., Jaramillo, D. E. (2014). Biofilm removal by 6% sodium hypochlorite activated by different irrigation techniques. *International Endodontic Journal*. <https://doi.org/10.1111/iej.12202>.

Pradeep, R., Anjaneyalu, K., Muralidharan, M. (2020). Advancements in Root Canal Irrigants-A Review. *Journal of Complementary Medicine Research*. <https://doi.org/10.5455/jcmr.2020.11.04.04>.

Ramirez-Mora, T., Dávila-Pérez, C., Torres-Méndez, F., & Valle-Bourrouet, G. (2019). Raman Spectroscopic Characterization of Endodontic Biofilm Matrices. *Journal of Spectroscopy*. <https://doi.org/10.1155/2019/1307397>.

Swimberghe, R. C. D., Coenye, T., De Moor, R. J. G., & Meire, M. A. (2019). Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. *International Endodontic Journal*. <https://doi.org/10.1111/iej.13050>.

Velázquez-Moreno, S., González-Amaro, A. M., Aragón-Piña, A., López-López, L. I., Sánchez-Sánchez, R., Pérez-Díaz, M. A., Oliva-Rodríguez, R., Lorenzo-Leal, A. C., González-Ortega, O., Martínez-Gutierrez, F., Bach, H. (2023) Use of a Cellulase from *Trichoderma reesei* as an Adjuvant for *Enterococcus faecalis* Biofilm Disruption in Combination with Antibiotics as an Alternative Treatment in Secondary Endodontic Infection. *Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15031010>.

Wong, J., Manoil, D., Näsman, P., Belibasakis, G.N., Neelakantan, P. (2021). Microbiological Aspects of Root Canal Infections and Disinfection Strategies: An Update Review on the Current Knowledge and Challenges. *Frontiers in Oral Health*. <https://doi.org/10.3389/froh.2021.672887>.

Apéndices



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
Av. Manuel Nava # 2, Zona Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P.

San Luis Potosí, S.L.P., 16 abril de 2020

M.C. SELENE VELÁZQUEZ MORENO
DOCTORADO EN CIENCIAS FARMACOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, UASLP
P R E S E N T E

Estimada M.C. Velázquez Moreno.

Por este conducto me dirijo a Usted en referencia a su trabajo de Investigación titulado "*Estudio de la matriz polimérica extracelular de biopelícula multiespecie de origen odontogénico*" Asignado con la clave: CEI-FE-017-020

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 Molnar, Dra. Norma Verónica Zavala Alonso, Dra. Claudia Edith Dávila Pérez, Dra. Rita Elizabeth Martínez Martínez, Dr. José Arturo Garrocho Rangel, Dr. Oscar Sánchez Ambrass Capello, Dr. Víctor Mario Fierro Serna y M.C. Ana María González Amaro. 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 considere 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-001-20180213 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) con vigencia al 13 de febrero de 2022.

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



Comité de Ética en Investigación y Docencia de la Facultad de Ciencias Químicas
Registro Número CONBIOÉTICA-24-CEI-003-20190726

21 de abril de 2021

DR. FIDEL MARTÍNEZ GUTIÉRREZ.
PROFESOR INVESTIGADOR.
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS.
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ.
PRESENTE.

Con relación a su solicitud de revisión del protocolo : "ESTUDIO DE LA MATRIZ POLIMÉRICA EXTRACELULAR DE BIOPELÍCULA MULTIESPECIE DE ORIGEN ODONTOGÉNICO", el cual fue aprobado por el comité de Ética en Investigación de la Facultad de Estomatología, con registro CEI-FE-017-020, se le comunica que éste fue evaluado en la sesión del 21 de abril del año en curso por el Comité de Ética en Investigación y Docencia de la Facultad de Ciencias Químicas (CEID-FCQ) (registro CONBIOÉTICA-24-CEI-003-20190726) y dictaminado como:

APROBADO

Su protocolo tiene la clave **CEID2021-05-5**.

Conforme al Reglamento del CEID-FCQ, todo protocolo registrado y aprobado queda sujeto al seguimiento señalado en el Art. 13, en particular al apartado 13.2.2:

El profesor o investigador responsable deberá entregar al CEID-FCQ un informe al término del proyecto ante la suspensión prematura del estudio o cuando le sea requerido. Si el proyecto no ha sido terminado en el lapso de un año deberá entregarse un informe anual que señale el grado de avance. Para la entrega de este informe se considerará un año transcurrido desde la fecha de emisión del dictamen de aprobación y un lapso no mayor de 10 días hábiles. El incumplimiento de lo anterior impedirá la revisión de un nuevo protocolo del investigador solicitante. El informe se enviará al CEID-FCQ con una carta de presentación dirigida al Presidente, así como el respectivo informe.

Artículos publicados



Recibido: 29.02.2020 | Aceptado: 11.06.2020

Palabras clave: Antimicrobianos, biopelícula, cavidad oral, microbiota, prevención.

Microorganismos en la cavidad oral: microbiota y biopelículas

S ELENE VELÁZQUEZ MORENO
FIDEL MARTÍNEZ GUTIÉRREZ
POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, UASLP

Se estima que en nuestro cuerpo existen aproximadamente dos kilogramos (kg) de microorganismos y virus (microbiota), principalmente en el tracto gastrointestinal, la cavidad oral, la piel y el tracto genital, con funciones específicas en cada uno de ellos

Act

VELÁZQUEZ, S. Y MARTÍNEZ, F. F. PÁGINAS 19-20



Article

Use of a Cellulase from *Trichoderma reesei* as an Adjuvant for *Enterococcus faecalis* Biofilm Disruption in Combination with Antibiotics as an Alternative Treatment in Secondary Endodontic Infection

Selene Velázquez-Moreno ¹, Ana Maria González-Amaro ², Antonio Aragón-Piña ³, Lluvia Itzel López-López ⁴, Roberto Sánchez-Sánchez ⁵, Mario Alberto Pérez-Díaz ^{5,6}, Ricardo Oliva Rodríguez ², Ana C. Lorenzo-Leal ⁷, Omar González-Ortega ^{8,9}, Fidel Martínez-Gutiérrez ^{1,9,10,*} and Horacio Bach ^{7,*}

- ¹ Microbiology Laboratory, School of Chemical Sciences, Autonomous University of San Luis Potosí, San Luis Potosí 78300, Mexico
 - ² Endodontics Postgraduate Program, School of Dentistry, Autonomous University of San Luis Potosí, San Luis Potosí 78300, Mexico
 - ³ Electronic Microscopy Laboratory, Institute of Metallurgy, Autonomous University of San Luis Potosí, San Luis Potosí 78300, Mexico
 - ⁴ Institute of Desert Zones, Autonomous University of San Luis Potosí, San Luis Potosí 78300, Mexico
 - ⁵ National Institute of Rehabilitation, Mexico City 14389, Mexico
 - ⁶ Biomembranes Laboratory, National School of Biological Sciences, National Polytechnic Institute, Mexico City 07738, Mexico
 - ⁷ Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, University of British Columbia, Vancouver, BC V6T 1Z4, Canada
 - ⁸ Bioseparations Laboratory, School of Chemical Sciences, Autonomous University of San Luis Potosí, San Luis Potosí 78300, Mexico
 - ⁹ Center for Research in Health Sciences and Biomedicine, Autonomous University of San Luis Potosí, San Luis Potosí 78300, Mexico
 - ¹⁰ Laboratorio de Antimicrobianos Biopelículas y Microbiota, Facultad de Ciencias Químicas, Autonomous University of San Luis Potosí, San Luis Potosí 78210, Mexico
- * Correspondence: fidelmicro@gmail.com (F.M.-G.); hbach@mail.ubc.ca (H.B.); Tel.: +1-604-8754111 (ext. 62107) (H.B.)



Citation: Velázquez-Moreno, S.; González-Amaro, A.M.; Aragón-Piña, A.; López-López, L.I.; Sánchez-Sánchez, R.; Pérez-Díaz, M.A.; Oliva Rodríguez, R.; Lorenzo-Leal, A.C.; González-Ortega, O.; Martínez-Gutiérrez, F.; et al. Use of a Cellulase from *Trichoderma reesei* as an Adjuvant for *Enterococcus faecalis* Biofilm Disruption in Combination with Antibiotics as an Alternative Treatment in Secondary Endodontic Infection. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 1010. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15031010>

Academic Editor: Igor Tsesis

Received: 22 February 2023

Revised: 12 March 2023

Accepted: 16 March 2023

Published: 21 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Apical periodontitis is an inflammation leading to the injury and destruction of periradicular tissues. It is a sequence of events that starts from root canal infection, endodontic treatment, caries, or other dental interventions. *Enterococcus faecalis* is a ubiquitous oral pathogen that is challenging to eradicate because of biofilm formation during tooth infection. This study evaluated a hydrolase (CEL) from the fungus *Trichoderma reesei* combined with amoxicillin/clavulanic acid as a treatment against a clinical *E. faecalis* strain. Electron microscopy was used to visualize the structure modification of the extracellular polymeric substances. Biofilms were developed on human dental apices using standardized bioreactors to evaluate the antibiofilm activity of the treatment. Calcein and ethidium homodimer assays were used to evaluate the cytotoxic activity in human fibroblasts. In contrast, the human-derived monocytic cell line (THP-1) was used to evaluate the immunological response of CEL. In addition, the secretion of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α and the anti-inflammatory cytokine IL-10 were measured by ELISA. The results demonstrated that CEL did not induce the secretion of IL-6 and TNF- α when compared with lipopolysaccharide used as a positive control. Furthermore, the treatment combining CEL with amoxicillin/clavulanic acid showed excellent antibiofilm activity, with a 91.4% reduction in CFU on apical biofilms and a 97.6% reduction in the microcolonies. The results of this study could be used to develop a treatment to help eradicate persistent *E. faecalis* in apical periodontitis.

Keywords: extracellular polymeric substances; bioreactor; endodontics; enzyme; root canal treatment; biofilm; *Enterococcus faecalis*; cellulase; inflammatory response



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Oral Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/archoralbio

Multispecies oral biofilm and identification of components as treatment target

Selene Velázquez-Moreno^a, Norma V. Zavala-Alonso^b, Ricardo Oliva Rodríguez^c, Mildred Quintana^{d,e}, Hiram Joazet Ojeda-Galván^e, Omar Gonzalez-Ortega^{a,e}, Fidel Martínez-Gutiérrez^{a,e,*}

^a Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava No. 6, Zona Universitaria, CP 78210 San Luis Potosí, SLP, México

^b Especialidad en Ortodoncia, Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava No. 2, Zona Universitaria, CP 78290 San Luis Potosí, SLP, México

^c Maestría en Ciencias Odontológicas, Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava No. 2, Zona Universitaria, CP 78290 San Luis Potosí, SLP, México

^d Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Parque Chapulaptec 1570, CP 78210 San Luis Potosí, SLP, México

^e Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biotecnología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Sierra Leona No. 550, Lomas CP 28210, San Luis Potosí, SLP, México

ARTICLE INFO

Keywords:

Endodontic infections
Standardized biofilm model
Root canal disinfection
Treatment target

ABSTRACT

Endodontic infections involve a multispecies biofilm, making it difficult to choose an antimicrobial treatment. Characteristics such as the pathogens involved and number of microorganisms, nutrients, material surface to develop the biofilm, flow and oxygenation conditions are important for biofilm development using *in vitro* models.

Objective: To develop a standardized biofilm model, which replicates the main features (chemical, microbiological, and topographical) of an infected root canal tooth to detect components as treatment target.

Design: Clinical strains of *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, and *Actinomyces israelii* were isolated, and a multispecies biofilm was developed using continuous laminar flow reactors under anaerobic conditions in human dental roots. The microbiological composition was determined by counting colony-forming units and scanning electron microscope micrographs. In addition, the chemical composition of the extracellular matrix was determined by vibrational Raman spectroscopy and liquid chromatography of biofilm supernatant treated with enzymes.

Results: *E. faecalis* turned out to be the main microorganism in mature biofilms, this was related to the presence of β -galactosidase detected by vibrational Raman spectroscopy. After the enzymatic treatment of the extracellular polymeric substance, the presence of mannose and glucose was established.

Conclusion: The present work contributes to better understanding of standard conditions to develop a multispecies biofilm in human dental roots, which could have an impact on the generation of new root canal disinfection techniques in endodontic pathologies.

1. Introduction

Biofilms are sessile communities of several microorganisms irreversibly attached to a surface; these microorganisms go from a planktonic state to interaction with the surface and excretion of extracellular polymeric substance (EPS) (Cheah & Chan, 2022). The development of a

biofilm infection can be described in four stages: 1) surface colonization by microorganisms, 2) development of microcolonies (a process that involves cell multiplication and the formation of small amounts of EPS), 3) biofilm maturation (which involves a large production of extracellular matrix and development of quorum sensing), and 4) the spread of microorganisms to colonize and infect new surfaces (Ch'ng et al.,

* Correspondence to: Laboratorio de Antimicrobianos Biopelículas y Microbiota, Facultad de Ciencias Químicas, UASLP, Av. Dr. Manuel Nava No. 6 Zona Universitaria, CP 78210 San Luis Potosí, SLP, México.

E-mail addresses: fidel@uaslp.mx, fidelmicro@gmail.com (F. Martínez-Gutiérrez).

¹ ORCID: 0000-0002-2760-8273

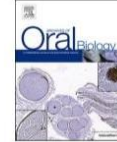
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2023.105821>

Received 14 August 2023; Received in revised form 4 October 2023; Accepted 7 October 2023
0003-9969/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Oral Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/archoralbio

Effectiveness in root canal disinfection and biocompatibility of a final *in vitro* irrigation protocol based on cellulases and a hyperosmotic solution

Selene Velázquez-Moreno^a, Norma V. Zavala-Alonso^b, Ricardo Oliva Rodríguez^c,
Roberto Sánchez Sánchez^d, Carlos Martín Torre Morales^d, Omar Gonzalez-Ortega^{a,e},
Fidel Martínez-Gutierrez^{a,e,1,*}

^a Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava No. 6, Zona Universitaria, San Luis Potosí, SLP CP 78210, Mexico

^b Especialidad en Ortodoncia, Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava No. 2, Zona Universitaria, San Luis Potosí, SLP CP 78290, Mexico

^c Maestría en Ciencias Odontológicas, Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava No. 2, Zona Universitaria, San Luis Potosí, SLP CP 78290, Mexico

^d Instituto Nacional de Rehabilitación, Calz Mexico-Xochimilco 289, Ciudad de Mexico CP 14389, Mexico

^e Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Sierra Leona No. 550, Lomas, San Luis Potosí, SLP CP 28210, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
Endodontic infections
Multispecies root canal biofilms
Treatment target

ABSTRACT

Objective: To evaluate the antimicrobial capacity and cell viability of a final irrigation protocol based on the use of a hydrolases enzymes mixture (HEM) and a hyperosmotic solution (HS) as an alternative to conventional protocols.

Methods: Root canals from 28 human first molars were used to develop multispecies anaerobic biofilms in standard reactors and irrigated with various protocols according to the following groups. Group A: control (sterile saline), group B: 2.25 % NaOCl, group C: 1 % NaOCl, group D: HS, group E: 100 U/mL HEM + 1 % NaOCl, group F: 100 U/mL HEM + HS, or group G: 100 U/mL HEM. The disinfection evaluation per group was carried out by CFU counting and Scanning Electron Microscopy (SEM). The viability was determined on fibroblasts.

Results: The F group, which consisted in irrigating with HEM + HS, had a biofilm elimination of over 5.33 (Log reduction), as well as the groups treated with NaOCl with eliminations of up to 5.34 (Log reduction). In addition, the evaluation of viability reflects a biocompatibility of the F group treatment, as opposed to the groups treated with NaOCl.

Conclusions: The irrigation protocols with HEM+HS and HEM+NaOCl turned out to be as efficient as the conventional protocol using NaOCl; moreover, the irrigation protocol with HEM+HS had low cell cytotoxicity in the viability assay when compared to cell cultures exposed to NaOCl.

Clinical significance: It is imperative that new and innovative ways are found for root canal therapy to ensure that the root canal system can be thoroughly cleaned.

1. Introduction

The oral cavity has recorded several microorganisms that include about 700 species of the so-called oral microbiota (Benn et al., 2018), when an imbalance in the microbial composition exists, the dysbiosis process can develop pathologies such as halitosis, caries and

periodontitis, that could progress in diseases like root canal infection (Lee et al., 2021). Only the most suitable microorganisms in planktonic form damage the pulp and colonize and infect the root canal, developing a biofilm resistant to eradication (Du et al., 2020). Pathogens with high prevalence of strict anaerobic bacteria, facultative anaerobic bacteria, and yeasts can form a complex biofilm, which is resistant to elimination

* Correspondence to: Laboratorio de Antimicrobianos Biopelículas y Microbiota, Facultad de Ciencias Químicas, UASLP, Av. Dr. Manuel Nava No. 6 Zona Universitaria, San Luis Potosí, SLP CP 78210, Mexico.

E-mail address: fidelmicro@gmail.com (F. Martínez-Gutierrez).

¹ ORCID: 0000-0002-2760-8273

<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2024.106157>

Received 14 July 2024; Received in revised form 2 December 2024; Accepted 3 December 2024

Available online 5 December 2024

0003-9969/© 2024 Elsevier Ltd. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.