

**METABARCODING DE MICROBIOMAS DE DIENTES CON PERIODONTITIS APICAL SECUNDARIA  
ASINTOMÁTICA. ESTUDIO *IN VIVO***

**FABIAN ANDRÉS MOLINEROS TORRES  
GISSELLE HAIANA GUTIERREZ OSPINA**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE**

**FACULTAD DE SALUD  
ESCUELA DE ODONTOLOGIA  
POSGRADO DE ENDODONCIA  
SANTIAGO DE CALI**

**FECHA**

**17 de septiembre del 2025**



**METABARCODING DE MICROBIOMAS DE DIENTES CON PERIODONTITIS APICAL SECUNDARIA  
ASINTOMATICA. ESTUDIO *IN VIVO***

**FABIAN ANDRÉS MOLINEROS TORRES**

**GISSELLE HAIANA GUTIERREZ OSPINA**

**Especialidad en Endodoncia**

**DRA. PATRICIA RODRIGUEZ SANCHEZ**

Odontóloga, Endodoncista, Magíster en Ciencias Odontológicas.

**DRA. NATALIA ARAGON VELEZ**

Odontóloga, MSc en Epidemiología, PhD en Ciencias Biomédicas.

**UNIVERSIDAD DEL VALLE  
FACULTAD DE SALUD  
ESCUELA DE ODONTOLOGIA  
POSGRADO DE ENDODONCIA**

Nota de aceptación

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Firma del presidente del jurado

---

Firma del jurado

---

Firma del jurado

Santiago de Cali,

## **DEDICATORIA**

Dedicamos este trabajo a nuestras familias, pilar fundamental en nuestras vidas, por su amor, paciencia y apoyo incondicional a lo largo de este proceso. A nuestros padres, quienes nos enseñaron con su ejemplo el valor del esfuerzo, la responsabilidad y la perseverancia. También extendemos nuestra gratitud a todas las personas que, de una u otra forma, aportaron a la realización de esta tesis.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos profundamente a Dios por brindarnos la fortaleza, salud y sabiduría necesarias para culminar esta etapa académica satisfactoriamente. A nuestras familias por su amor incondicional, por creer en nosotros incluso en los momentos más difíciles y por ser nuestra mayor fuente de motivación.

Un agradecimiento a nuestros docentes y asesores, quienes con su guía, paciencia y conocimientos enriquecieron este trabajo y contribuyeron de manera significativa a nuestro crecimiento académico y profesional.

Doctora Patricia Rodríguez Sánchez, Endodoncista y coordinadora del posgrado de Endodoncia de la Universidad del Valle.

Doctora Natalia Aragón, Odontóloga MsC PhD y docente de la Universidad del Valle

Doctor Nelson Rivera, Biólogo, MsC en ciencias biológicas candidato a doctorado en ciencias biológicas

Doctora Beatriz Parra PhD Microbiología e inmunología molecular.

A nuestros compañeros y amigos, por su apoyo, compañía y palabras de aliento durante todo este proceso.

## TABLA DE CONTENIDO

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>                                                  | 11 |
| <b>2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b>                                     | 12 |
| <b>3. MARCO TEÓRICO</b>                                                 | 15 |
| 3.1 Pulpa dental                                                        | 15 |
| 3.2 Tratamiento endodóntico                                             | 15 |
| 3.3 Infecciones de origen endodóntico Microbiología del canal radicular | 15 |
| 3.4 Periodontitis apical secundaria                                     | 16 |
| 3.5 Fracaso Endodóntico                                                 | 16 |
| 3.6 Microbiota asociada a tratamientos endodónticos fallidos            | 16 |
| 3.7 Genoma                                                              | 19 |
| 3.7.1 Virus                                                             | 20 |
| 3.7.2 Bacteria                                                          | 20 |
| 3.7.3 Genoma Bacteriano                                                 | 20 |
| 3.7.4 Arqueas                                                           | 21 |
| 3.7.5 Expresión génica                                                  | 21 |
| 3.7.6 Regulación transcripcional                                        | 21 |
| 3.8 Análisis microbianos moleculares de nueva generación                | 22 |
| 3.8.1 Preómica                                                          | 23 |
| 3.8.2 Secuenciación                                                     | 23 |
| 3.8.3 Metagenómica                                                      | 23 |
| 3.8.4 Metaómica integrada                                               | 24 |
| 3.9 Nanopore                                                            | 24 |
| 3.9.1 NanoDrop                                                          | 24 |
| 3.9.2 Electroforesis                                                    | 25 |
| 3.9.3 Barcode                                                           | 25 |
| 3.9.4 Proname                                                           | 25 |
| 3.9.4 NanoPlot                                                          | 25 |
| 3.9.5 Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs)                            | 26 |
| 3.9.6 Números Hill                                                      | 26 |
| <b>4. OBJETIVOS</b>                                                     | 27 |
| 4.1 OBJETIVO GENERAL                                                    | 27 |
| 4.2 OBEJTIVOS ESPECIFICOS                                               | 27 |
| <b>5. METODOLOGÍA</b>                                                   | 28 |
| 5.1 TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO                                            | 28 |

|                                                                                  |                               |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 5.2 AREA DE ESTUDIO                                                              | 28                            |
| 5.3 POBLACIÓN OBJETIVO                                                           | 28                            |
| 5.4 POBLACION DE ESTUDIO                                                         | 28                            |
| 5.4.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN                                                     | 28                            |
| 5.4.1.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN                                                   | 28                            |
| 5.4.1.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN                                                   | 28                            |
| 5.5 DISEÑO DE MUESTREO                                                           | 29                            |
| 5.5.1 CALCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA                                              | 29                            |
| 5.6 DEFICICIÓN DE VARIABLES                                                      | 29                            |
| 5.6.1 DEFINICIÓN DE LA VARIABLE DEPENDIENTE                                      | 29                            |
| 5.6.1.2 CUADRO OPERACIONAL DE LAS VARIABLES                                      | 30                            |
| 5.7 PROCESO DE EXTRACCIÓN, PREPARACIÓN DE LAS BIBLIOTECAS DE ADN Y ANÁLISIS      | 30                            |
| 5.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS                                                       | 31-31                         |
| <b>6. RESULTADOS</b>                                                             | 33                            |
| 6.1 SECUENCIACIÓN                                                                | 33                            |
| 6.2 RIQUEZA Y DIVERSIDAD                                                         | 33                            |
| 6.3 COMPOSICIÓN TAXONOMICA DE LA MICROBIOTA                                      | 34                            |
| <b>7. DISCUSIÓN</b>                                                              | 36-38                         |
| <b>8. RECOMENDACIONES</b>                                                        | 40                            |
| <b>9. CONCLUSIONES</b>                                                           | 40                            |
| <b>10. REFERENCIAS</b>                                                           | 41-45                         |
| <b>11. ANEXOS</b>                                                                | ¡Error! Marcador no definido. |
| 11.1 Aprobación del CIREH.                                                       | ¡Error! Marcador no definido. |
| 11.2 PROTOCOLO RECOMEDADO PARA RECOLECCIÓN MICROBIANA PARA INVESTIGACIÓN CLÍNICA | ¡Error! Marcador no definido. |
| 11.3 Secuencia fotográfica de toma de muestras                                   | ¡Error! Marcador no definido. |
| 11.4 Radiografías iniciales                                                      | ¡Error! Marcador no definido. |
| 11.5 Consentimiento informado                                                    | ¡Error! Marcador no definido. |

## LISTA DE TABLAS

|                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1.</b> Definición operacional de variables.....                                                                                              | 30 |
| <b>Tabla 2.</b> Características de las muestras según sexo, diente de la lesión, edad del paciente, lecturas simples y apareadas de alta calidad..... | 33 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Figura 1.</b> Detección de las 16 especies microbianas investigadas en conductos radiculares infectados en diferentes fases del retratamiento endodóntico en dientes con infección endodóntica persistente/secundaria mediante el método PCR anidado(32) .....                                                                                                                        | 17                                   |
| <b>Figura 2.</b> Gráfico de barras apilado de frecuencias de detección y niveles de especies/filotipos bacterianos en muestras de conductos radiculares de dientes tratados con periodontitis apical postratamiento (33). .....                                                                                                                                                          | 17                                   |
| <b>Figura 3.</b> Protocolo toma de muestras microbiológicas. A. Radiografía inicial, B. técnica anestésica y Profilaxis dental, C. Sellado periférico con barrera gingival, D. Desinfección con hipoclorito de sodio al 2.5%, E. Cavity de acceso a cámara pulpar, F. Remoción de gutapercha lima 25/08 AF retreatment (FANTA) y recolección toma de muestras en tubo de eppendorf. .... | <b>¡Error! Marcador no definido.</b> |
| <b>Figura 4.</b> Curva de rarefacción del número de especies observadas o Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU), en función del número de lecturas analizadas según Chao ( $q = 0$ ), Shannon ( $q = 1$ ) y Simpson ( $q = 2$ ) .....                                                                                                                                                 | 33                                   |
| <b>Figura 5.</b> Composición bacteriana y abundancia relativa (%) de especies identificadas por muestra mediante secuenciación del gen 16S rRNA.....                                                                                                                                                                                                                                     | 34                                   |
| <b>Figura 6.</b> Radiografías iniciales: <b>A.</b> Barcode 25, <b>B.</b> Barcode 26, <b>C.</b> Barcode 27, <b>D.</b> Barcode 28, <b>E.</b> Barcode 29, <b>F.</b> Barcode 30.....                                                                                                                                                                                                         | 51                                   |

## RESUMEN

La persistencia de infecciones endodónticas representa un desafío clínico frecuente que compromete la efectividad de los tratamientos. Aunque se reconoce el papel crucial de los microorganismos en estos casos, el conocimiento actual sobre su diversidad y comportamiento en tratamientos fallidos sigue siendo limitado. En este contexto, el estudio del microbioma oral ha cobrado relevancia, especialmente ante las limitaciones de los métodos bacteriológicos tradicionales, los cuales no permiten detectar microorganismos no cultivables. La técnica de metabarcoding, basada en la secuenciación del ADN ribosomal 16S rRNA, permite una identificación más precisa y profunda del microbioma; en este sentido, la integración del enfoque clínico con herramientas de análisis molecular ofrece nuevas perspectivas para el diagnóstico y tratamiento personalizado en endodoncia.

**Metodología:** Estudio piloto transversal, observacional, descriptivo in vivo que tuvo como objetivo caracterizar el microbioma presente en dientes con periodontitis apical secundaria asintomática mediante técnicas de metabarcoding basadas en secuenciación de tercera generación (Nanopore®). Se analizaron seis muestras clínicas obtenidas de pacientes atendidos en el servicio de Posgrado de Endodoncia de la Universidad del Valle (Cali, Colombia), entre noviembre de 2024 y marzo de 2025.

**Resultados:** Según el índice de riqueza de Chao, las muestras Barcode 29 y 30 presentaron la mayor cantidad de especies (aproximadamente 17), mientras que la muestra Barcode 26 fue la menos rica, con solo 7 especies. En cuanto a la diversidad, el índice de Shannon indicó que el Barcode 30 fue el más diverso con cerca de 12 especies de frecuencia media, seguido por Barcode 29 y Barcode 27; nuevamente, el Barcode 26 mostró la menor diversidad. El índice de Simpson, que considera las especies más dominantes, confirmó que el Barcode 30 conservó la mayor diversidad, mientras que los Barcode 28 y 26 evidenciaron una dominancia marcada de una sola especie.

Los resultados revelaron una alta variabilidad y diversidad microbiana entre individuos, con predominio de especies pertenecientes a los filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* y *Actinobacteria*. *Streptococcus oralis subsp. tigurinus*, *Veillonella parvula* y *Fusobacterium nucleatum* fueron algunos de los taxones más frecuentes.

**Conclusión:** Se concluye que las infecciones endodónticas secundarias no están asociadas a un patógeno único, sino a comunidades microbianas complejas y resistentes, lo cual subraya la necesidad de implementar estrategias terapéuticas más eficaces y personalizadas en endodoncia.

**Palabras claves:** Diversidad microbiana, Metabarcoding, Microbioma oral, Nanopore®, Periodontitis apical secundaria asintomática, Secuenciación 16S rRNA, Taxonomía bacteriana.

## 1. INTRODUCCIÓN

La periodontitis apical secundaria asintomática es una condición inflamatoria de origen infeccioso, asociada generalmente al fracaso de tratamientos endodónticos previos, en la que se observa una persistente lesión periapical sin síntomas clínicos evidentes (1,2). A pesar de la ausencia de manifestaciones clínicas, estas lesiones pueden mantenerse activas debido a la presencia de comunidades microbianas complejas y resistentes que colonizan el sistema de conductos radiculares.

En las últimas décadas, el estudio del microbioma oral ha cobrado gran relevancia, ya que se ha demostrado que la composición microbiana desempeña un papel determinante en la progresión y persistencia de diversas patologías endodónticas (3,4). Sin embargo, la mayoría de los métodos convencionales de identificación bacteriana, como el cultivo, tienen limitaciones importantes, principalmente porque no permiten detectar microorganismos de difícil cultivo o no cultivables (5-7).

La técnica de *metabarcoding*, basada en la secuenciación de regiones específicas del ADN ribosomal (como el 16S rRNA), ha emergido como una herramienta poderosa para la identificación y caracterización del microbioma, permitiendo un análisis más preciso, profundo y completo de las comunidades bacterianas presentes en muestras clínicas (8-11).

Este estudio *in vivo* tiene como objetivo principal explorar la composición del microbioma en dientes con periodontitis apical secundaria asintomática, mediante el uso de técnicas de *metabarcoding*, con el fin de identificar posibles perfiles microbianos característicos que contribuyan a una mejor comprensión de esta patología. Además, se busca aportar información valiosa que pueda servir como base para el desarrollo de estrategias diagnósticas más eficaces y tratamientos personalizados en el ámbito de la endodoncia.

La integración del enfoque clínico con el análisis microbiológico avanzado representa una oportunidad para avanzar en el conocimiento de las infecciones persistentes en endodoncia y, al mismo tiempo, abrir nuevas perspectivas para la práctica odontológica basada en evidencia molecular.

## 2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El éxito del tratamiento endodóntico depende de varios factores, tales como, la identificación de la afección mediante el diagnóstico, acceso a los conductos radiculares, conformación o preparación biomecánica, desinfección de los conductos, obturación completa y hermética del conducto radicular (12). El proceso de desinfección del canal radicular mediante la implementación de protocolos de irrigación, se considera igualmente importante, todo esto con un seguimiento periódicos de los procedimientos los cuales pueden llegar a asegurarnos un éxito a largo plazo. También, es importante para eliminar microorganismos al interior del canal, la irrigación adecuada de la cámara pulpar y los conductos radiculares. Además, el seguimiento y la evaluación periódica del diente tratado son importantes para asegurar que el tratamiento haya sido exitoso a largo plazo (13,14).

Actualmente el desbridamiento químico-mecánico es un método efectivo para eliminar biopelículas adheridas a las superficies de paredes radiculares, en los canales infectados, las biopelículas solo tendrán posibilidades de eliminarse si se combinan irrigantes con mecanismos de acción que destruyan la membrana celular y alteren la replicación genética de los microorganismos que conforman estas biopelículas. Además, se necesitan estrategias para mejorar el control de infecciones no solo en el conducto principal, sino también en todo el sistema de conductos radiculares accesorios. Las superficies del conducto radicular que no son adecuadamente preparadas durante el tratamiento endodóntico pueden tener implicaciones clínicas relevantes. En estas áreas inaccesibles, los microorganismos pueden persistir, y causar infecciones que contribuyen al fracaso del tratamiento endodóntico (15,16).

Otro aspecto a tener en cuenta, en conductos rectos o con curvaturas, la cantidad de área de superficies no tocadas después de la preparación varía considerablemente (15), pueden oscilar entre un 10% y un 80% de la superficie total del canal. Esto significa que, aunque en algunos casos la preparación es más completa y abarca la mayoría del conducto, en otros casos aún queda una parte significativa sin instrumentar (17). Igualmente, estas variaciones pueden deberse a factores, tales como la técnica aplicada, sistema mecanizado utilizado, habilidad del operador y la complejidad de la anatomía del conducto radicular (17). Es importante tener en cuenta estos hallazgos anatómicos al realizar tratamientos de conductos, ya que una preparación incompleta puede influir en el éxito a largo plazo del tratamiento endodóntico y aumentar el riesgo de problemas posteriores como la persistencia de infecciones o la recurrencia de los síntomas (17). Los avances en tecnologías de imagen como la micro-CT han sido fundamentales para comprender mejor la morfología de los conductos radiculares y mejorar las técnicas de tratamiento endodóntico (18-20).

Diferentes estudios han demostrado que las infecciones del conducto radicular presentan una flora bacteriana de naturaleza polimicrobiana, con un marcado predominio de bacterias anaeróbicas (21,22).

La persistencia de estos microorganismos, especialmente en casos de infección secundaria o recurrente, se ha asociado con el fracaso del tratamiento endodóntico, debido a la incapacidad de erradicar completamente el patógeno durante la terapia. Esta situación desencadena una serie de respuestas inflamatorias, dentro de las cuales se activa la actividad proteolítica de células del sistema inmunológico como los polimorfonucleares, macrófagos y mastocitos. Como consecuencia, se produce el reclutamiento de osteoclastos en el sitio, culminando en la formación de una cavidad ósea (23), la cual es característica de la periodontitis apical o una lesión radiográfica (24,25). Las infecciones endodónticas persistentes a menudo son causadas por *Enterococcus faecalis*, pero también bacilos entéricos como *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Anaerococcus prevotii*, *Eggerthella lenta*, *Gemella morbillorum*, *Parvimonas micra*, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium propionicum*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Streptococcus anginosus*, *streptococcus mitis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* y *Cándida albicans* (26). Estas bacterias pueden encontrarse en mono infecciones o en unión a otras especies, se reconoce que *Enterococcus faecalis* mantiene un ambiente alcalino y puede sobrevivir largos períodos sin nutrientes (27). A pesar de que el *Enterococcus faecalis* se relaciona con infecciones persistentes o secundarias del conducto radicular, también se han encontrado cepas de este microorganismo en infecciones primarias de origen endodóntico (28).

Un sellado coronal inadecuado, presencia de microfiltraciones, errores en la preparación química y/o mecánica del canal radicular, así como limitaciones y deficiencias en la calidad del material de obturación del conducto, pueden propiciar la persistencia de la infección endodóntica, este escenario podría desencadenar periodontitis apical y, en última instancia, resultar en el fracaso del tratamiento endodóntico (29,25).

Es esencial adquirir comprensión acerca de varios aspectos relacionados con la importancia de las bacterias identificadas en las muestras después del tratamiento. Investigaciones sobre las bacterias presentes en el conducto radicular después de un tratamiento endodóntico comprende tres etapas fundamentales en la recolección de muestras: post instrumentación (obtenidas después de la finalización de los procedimientos químico mecánicos), muestras recolectadas posteriores a la medicación, y muestras post obturación (recolectadas en dientes sometidos a tratamiento de conductos radiculares con lesiones de periodontitis apical asociadas (25-30).

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método molecular fundamental en microbiología que se emplea para la amplificación selectiva de fragmentos específicos de ADN. Su aplicación principal radica en la detección y amplificación de secuencias genéticas específicas, lo que facilita la identificación de organismos particulares en una muestra. Por lo general, la PCR se adapta para amplificar regiones específicas del genoma de un organismo objetivo, brindando así una herramienta efectiva para la identificación de virus, bacterias, hongos y otros microorganismos presentes en la muestra

analizada (31,32). Los análisis moleculares centrados en los genes del ADN ribosómico (ADNr) han desempeñado un papel fundamental en la investigación de la microbiología endodóntica. Estos métodos moleculares son ampliamente reconocidos por su alta sensibilidad, rapidez y capacidad para detectar y cuantificar agentes infecciosos presentes en los conductos radiculares. Entre sus principales ventajas se destaca la posibilidad de analizar las muestras en términos de abundancia relativa, permitiendo no solo identificar microorganismos difíciles de cultivar mediante técnicas tradicionales, sino también ofrecer una mayor practicidad, resolución y sensibilidad en la caracterización del microbioma (33).

La secuenciación del genoma completo, conocida como *Whole Genome Sequencing* (WGS), permite obtener la secuencia total del material genético presente en una muestra, abarcando todos los microorganismos detectados. Esta metodología se diferencia del *metabarcoding*, el cual se limita al análisis de una región génica específica, como el gen 16S rRNA en bacterias. Este gen presente en el ADN de bacterias y arqueas, codifica para la subunidad pequeña (30S) del ribosoma, esencial en la síntesis de proteínas. La secuencia del gen 16S rRNA presenta regiones altamente conservadas intercaladas con regiones variables, lo que permite su uso como marcador molecular para la identificación y diferenciación de especies bacterianas. Las regiones conservadas facilitan el diseño de *primers* universales, permitiendo así la amplificación de este gen en una amplia gama de bacterias y, por consiguiente, la evaluación del microbioma bacteriano de forma integral. Ampliamente empleado en microbiología molecular y filogenia bacteriana, el gen 16S se amplifica mediante PCR y se secuencia para identificar y clasificar bacterias en diversas muestras ambientales o clínicas (23,34). A diferencia de otras técnicas, la metagenómica no se limita a la amplificación de secuencias genéticas específicas, sino que se centra en la secuenciación y análisis de todo el ADN presente en la muestra. La secuenciación integral del metagenoma ofrece una información detallada, tanto cualitativa como cuantitativa, acerca de todas las categorías de microorganismos presentes (23).

**Pregunta de investigación:** ¿Cuáles son los microorganismos presentes en dientes con tratamiento de conducto radicular fallido?

### **3. MARCO TEÒRICO**

#### **3.1 Pulpa dental**

La pulpa dental, un tejido conectivo laxo derivado del ectomesénquima, está íntimamente asociada a la dentina, formando así el complejo dentino-pulpar. Este tejido se encuentra rodeado por las paredes dentinarias y está delimitado por un techo, siendo el foramen apical la única vía de irrigación e inervación. La caries dental, el trauma dentoalveolar y, en menor medida, el desgaste y la erosión pueden desencadenar procesos degenerativos en la pulpa, que pueden desembocar en necrosis pulpar e infección periapical. En estas condiciones, las células pulpares experimentan cambios degenerativos que culminan en muerte celular. Este ambiente propicia la invasión bacteriana y la subsiguiente formación de un biofilm, acompañado de la acumulación de residuos tóxicos (35).

#### **3.2 Tratamiento endodóntico**

Según la Asociación Americana de Endodoncia (AAE), el tratamiento endodóntico representa un procedimiento odontológico dirigido a la corrección de afecciones en el interior del diente, centrándose especialmente en la pulpa dental y los conductos radiculares. Este procedimiento comprende la extracción del tejido pulpar enfermo o infectado, seguido de la limpieza, modelado y desinfección de los conductos radiculares, con el sellado subsiguiente para evitar la posibilidad de reinfección. El objetivo primordial del tratamiento endodóntico es conservar la integridad estructural del diente y recuperar su funcionalidad habitual, aliviando el dolor y previniendo la extensión de la infección hacia los tejidos adyacentes (36).

#### **3.3 Infecciones de origen endodóntico Microbiología del canal radicular**

Los microorganismos y los subproductos resultantes de su metabolismo son considerados los principales factores etiológicos involucrados en el desarrollo de la necrosis pulpar y las lesiones periapicales, siendo determinantes en el fracaso del tratamiento endodóntico. A través de cultivos microbiológicos, se ha logrado identificar los diversos patógenos presentes en las infecciones endodónticas, lo que permite diferenciar entre infecciones primarias y secundarias, caracterizadas por la predominancia de bacterias anaerobias estrictas y anaerobias facultativas. Las infecciones extrarradiculares, que pueden estar relacionadas con la infección intrarradicular; y las infecciones endodónticas persistentes o secundarias, donde los microorganismos resistentes que sobreviven al tratamiento persisten en el interior del diente, incluso después de la desinfección intrarradicular y durante la obturación (37).

Solano et al. (2014) han determinado que la mayoría de los microorganismos predominantes en el biofilm son una variedad de bacterias con características distintivas que se congregan y establecen su propio

entorno microbiano para garantizar su supervivencia y protección. Este hallazgo ha impulsado una serie de investigaciones con el propósito de desarrollar estrategias efectivas para enfrentar y neutralizar su actividad. Dentro de la microbiota, se encuentran formaciones altamente organizadas y complejas denominadas biopelículas, cuyas propiedades difieren notablemente de los microorganismos en suspensiones planctónicas. Las infecciones del conducto radicular están mediadas por estas biopelículas, dada la complejidad y variabilidad del sistema de conductos radiculares, así como la diversidad de especies presentes en las biopelículas, la desinfección de este sistema representa un desafío extremadamente complicado (38).

### **3.4 Periodontitis apical secundaria**

La periodontitis apical secundaria, también conocida como periodontitis apical persistente o recurrente, es una afección inflamatoria que afecta los tejidos periapicales alrededor de la raíz de un diente previamente sometido a tratamiento endodóntico, la cual se manifiesta cuando existe persistencia o reaparición de la infección en el área periapical después de un tratamiento endodóntico inicial. Esta situación puede ser causada por diversos factores, como la presencia de microorganismos resistentes a la desinfección, una limpieza y obturación inadecuadas de los conductos radiculares, así como la fractura o filtración del material restaurado (25).

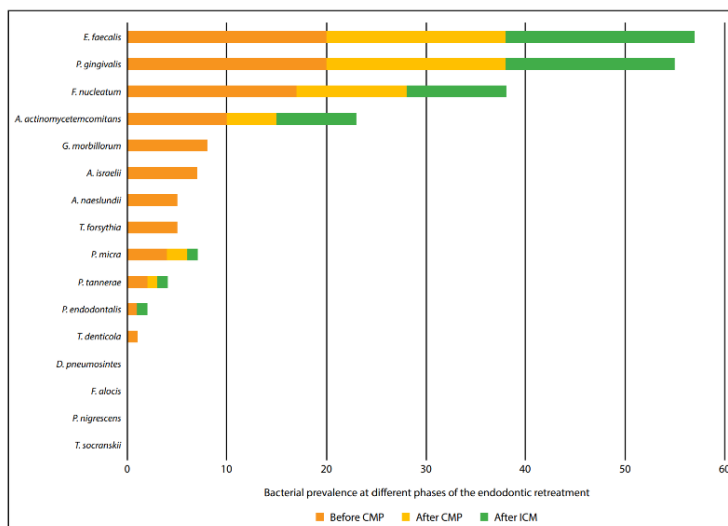
### **3.5 Fracaso Endodóntico**

El fracaso del tratamiento endodóntico se evidencia por la formación o el mantenimiento de una periodontitis apical crónica. También existen otros factores que pueden llevar al fracaso del tratamiento endodóntico, como la filtración coronal y las infecciones extrarradiculares. Es esencial tener en cuenta estos aspectos durante el examen clínico, ya que comprender la causa del fracaso es fundamental para gestionar la situación de manera adecuada. Cuando un diente ha experimentado un tratamiento endodóntico que ha fallado, se puede considerar el retratamiento endodóntico no quirúrgico o la cirugía apical como opciones para abordar el problema (39).

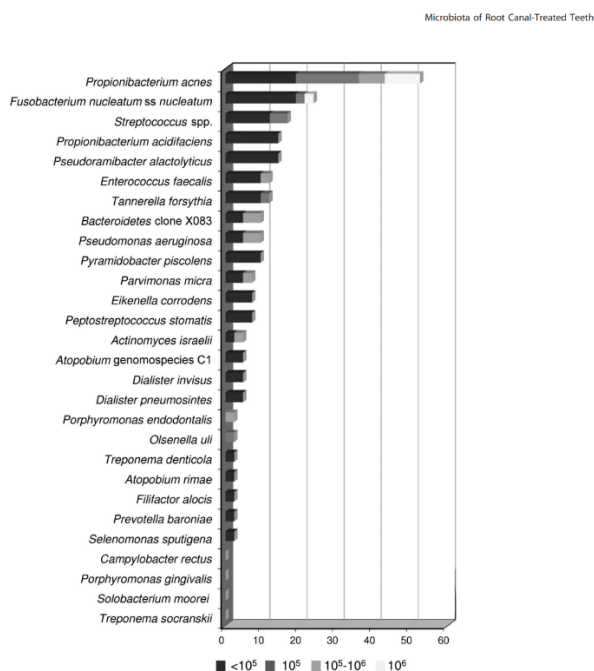
### **3.6 Microbiota asociada a tratamientos endodónticos fallidos**

La microbiota asociada al fracaso del tratamiento endodóntico se describe como polimicrobiana y heterogénea, compuesta por microorganismos capaces de resistir la terapia endodóntica y sobrevivir en un entorno desfavorable inducido por dicha terapia. Se ha observado una alta prevalencia de microorganismos Gram-positivos, como *Enterococcus faecalis* y *Parvimonas micra*, en casos de periodontitis apical crónica postratamiento. Además, mediante técnicas moleculares altamente sensibles, como la reacción en cadena de la polimerasa, se ha identificado la presencia de microorganismos Gram

negativos y anaerobios estrictos en casos de infecciones secundarias/persistentes (37, 40). Estudios experimentales han evidenciado una serie de microorganismos presentes en lesiones endodónticas persistentes o tratamientos endodónticos fallidos. **Figura 1 y 2** (41,42):



**Figura 1.** Detección de las 16 especies microbianas investigadas en conductos radiculares infectados en diferentes fases del retratamiento endodóntico en dientes con infección endodóntica persistente/secundaria mediante el método PCR anidado(32)



**Figura 2.** Gráfico de barras apilado de frecuencias de detección y niveles de especies/filotipos bacterianos en muestras de conductos radiculares de dientes tratados con periodontitis apical postratamiento (33).

Diversos estudios han examinado biofilms en el conducto radicular y la composición bacteriana de los dientes con periodontitis apical después del tratamiento endodóntico. Sin embargo, los resultados muestran una notable variabilidad en el patógeno predominante en los casos donde el tratamiento ha fracasado (43-46).

Pinheiro y colaboradores indicaron en 2003 que *E. faecalis* es el microorganismo más comúnmente encontrado de manera estadísticamente significativa (45,8%) en conductos radiculares previamente obturados, seguido por *Fusobacterium* (6,7%) y *Propionibacterium* (3,3%) (47). Hallazgos similares fueron informados por Siqueira y Rôças mediante el uso de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con una prevalencia del 77% y 79,5% de *E. faecalis*, respectivamente (48). Además, estos investigadores observaron que la presencia de *E. faecalis* es más frecuente en las infecciones secundarias (89,6%) que en las primarias (67,5%), con una prevalencia de *E. faecalis* del 77% y 79,5%, respectivamente, con diferencias estadísticamente significativas (49).

Estudios recientes no respaldan la idea de que la bacteria *E. faecalis* sea la principal responsable del fracaso endodóntico. Endo y colaboradores, en 2013, encontraron que el microorganismo más frecuentemente aislado, presente en el 24% de los casos, fue *Parvimonas micra* (50). Schirrmeister y colaboradores también detectaron esta bacteria en su investigación; sin embargo, a diferencia de estudios anteriores, *Parvimonas micra* ocupó el tercer lugar en prevalencia, siendo precedida por *Solbacterium moorei* y *Fusobacterium nucleatum*. Pereira y colaboradores, en 2017, destacaron a *Fusobacterium nucleatum* como la bacteria más prevalente (71,6%) en dientes con periodontitis post-tratamiento. Un estudio similar realizado por Siqueira también identificó a *Fusobacterium nucleatum* como la más prevalente (15%). Rôças y Siqueira reafirmaron la importancia de *Fusobacterium nucleatum* en 2012, obteniendo una prevalencia del 24%, situándose como la segunda bacteria más común. Sin embargo, Henriques y colaboradores, en 2016, señalaron a *Corynebacterium diphtheriae* como la bacteria más relevante asociada con el fracaso endodóntico (51-53).

En el 2022 Siqueira y colaboradores evidenciaron que, en la porción apical de los conductos radiculares tratados por periodontitis apical, es más común encontrar, en el 46% de los casos, la presencia de *proteobacterias* (45). Unos años antes, en 2012, el mismo Siqueira en colaboración con Rôças, identificó a *Propionibacterium acnes* (con una prevalencia del 52%) como el microorganismo más frecuentemente hallado en casos de periodontitis apical post-tratamiento (54). En otro estudio, este mismo autor señaló a la *Propionibacterium propionicum* como la bacteria más prevalente (con una prevalencia del 52%) después de *E. faecalis*. Schirrmeister y colaboradores corroboraron la presencia de *Propionibacterium acnes* en dientes con fracaso endodóntico en 2 de cada 10 casos. La resistencia de esta bacteria a las medidas de desinfección se atribuye a su capacidad para buscar fuentes alternativas de nutrientes, evadir las defensas del huésped, sobrevivir en el tejido de granulación presente fuera de los conductos y su habilidad para adherirse, coagregarse y sobrevivir en la zona extraradicular (51-53).

Estos microorganismos presentan características específicas que les permiten evadir tanto la instrumentación mecánica como la química realizada durante el tratamiento endodóntico. Estas

características se pueden resumir en su habilidad para formar biofilms altamente adherentes y colonizar áreas distantes de los conductos radiculares, como los deltas apicales, los istmos y los conductos laterales, que son difíciles de alcanzar mediante la instrumentación debido a la protección proporcionada por residuos tisulares, dentina, suero y células muertas que inactivan o reducen la efectividad de los agentes antimicrobianos. Además, estas bacterias suelen exhibir resistencia intrínseca a los agentes antimicrobianos, capacidad para adaptarse mediante la activación de genes de supervivencia y la utilización de vías metabólicas alternativas, así como habilidades de agregación bacteriana y sinergismo. Todo esto se suma a su ubicación en áreas donde las fuentes de nutrientes se ven mínimamente afectadas (26).

### **3.7 Genoma**

Desde la concepción del concepto de genoma en 1920, el ámbito de la ciencia genómica ha experimentado un notable desarrollo, abarcando una diversidad de temas interrelacionados, tales como la química de los ácidos nucleicos, la estructura molecular, la bioquímica de la replicación y la expresión, así como los procesos mutacionales, la dinámica evolutiva y las interacciones celulares.

Las células constituyen la unidad básica de la vida en cualquier organismo, compartiendo tres características esenciales: una membrana celular, citoplasma y un genoma. Desde un punto de vista estructural, las células se clasifican en dos tipos principales: procariotas y eucariotas. Las células eucariotas, generalmente más complejas, se caracterizan por la presencia de un núcleo y otros orgánulos membranosos especializados, como las mitocondrias y los plástidos, cada uno con funciones específicas. Por otro lado, las células procariotas presentan una organización celular más simple y carecen de orgánulos membranosos. Aunque comparten similitudes en su estructura, los procariotas se dividen en dos dominios claramente distintos: las eubacterias, comúnmente conocidas como bacterias, y las arqueas. Estos dos grupos difieren fundamentalmente tanto en su composición genética como en su fisiología celular (55,56).

Un genoma representa la totalidad del ácido desoxirribonucleico (ADN) de un organismo, abarcando la totalidad de sus genes. Cada genoma contiene la información necesaria para la construcción y el mantenimiento del organismo correspondiente. En el caso de los seres humanos, un genoma consiste en más de tres mil millones de pares de bases de ADN, que conforman una copia completa de toda su información genética (57).

### **3.7.1 Virus**

Los virus son agentes infecciosos que requieren células vivas como huésped para su reproducción y son incapaces de hacerlo en ausencia de estos. A diferencia de las células, los virus carecen de dos atributos esenciales que definen a una célula: no tienen membrana celular ni citoplasma. El hallazgo de los virófagos, virus que parasitan a otros virus, ha reabierto el debate sobre si los virus deben considerarse organismos vivos. Algunos sostienen que los virus son entidades vivas debido a su capacidad para servir de hospedaje a otros virus, lo que implica un estado inicial "vivo". Sin embargo, otros argumentan que la incapacidad de los virus para reproducirse fuera de una célula huésped los clasifica como entidades no vivas (58,59).

### **3.7.2 Bacteria**

La célula bacteriana, al ser procariota, presenta una estructura relativamente simple en comparación con las células eucariotas. Falta de orgánulos membranosos, y su cromosoma, típicamente único, no está segregado del resto de los componentes celulares. Aunque mayormente unicelulares, las bacterias con frecuencia se agrupan para formar biopelículas, comunidades celulares unidas por una matriz polimérica secretada, donde muestran diversos comportamientos cooperativos. Además, tienen la capacidad de diferenciarse en distintos tipos celulares, lo que significa que células con el mismo genoma pueden tener morfologías y funciones diferentes. Solo una pequeña fracción de la diversidad bacteriana (menos del 1%) puede ser cultivada y desarrollada en condiciones de laboratorio. La dificultad para cultivar bacterias en laboratorio se debe a nuestro conocimiento limitado sobre sus procesos fisiológicos y las interacciones necesarias para su crecimiento (60).

El ciclo celular bacteriano implica la coordinación entre la replicación del genoma y la distribución de las copias replicadas en las células hijas, seguido por la división celular. Este proceso asegura la transmisión "vertical" del material genético de una generación celular a la siguiente. En condiciones óptimas, ciertas especies bacterianas pueden completar su ciclo celular en tan solo 20 minutos, lo que implica que una única célula podría generar más de mil millones de descendientes en apenas 10 horas (60,61).

### **3.7.3 Genoma Bacteriano**

La replicación del ADN bacteriano comienza en una secuencia específica conocida como origen de replicación. Las proteínas involucradas se unen a este sitio y la síntesis del ADN avanza en ambas direcciones. En los cromosomas circulares, hay un único origen de replicación, y la replicación concluye cuando las dos horquillas de replicación se encuentran. En contraste, los cromosomas bacterianos lineales generalmente tienen un origen central y la replicación progresa en ambas direcciones, similar a

los cromosomas circulares. Sin embargo, las enzimas de replicación no pueden sintetizar nuevo ADN en los extremos de un cromosoma lineal, lo que resulta en un acortamiento gradual del ADN después de cada evento de replicación. Por lo tanto, los cromosomas lineales requieren estructuras terminales llamadas telómeros para protegerse de la degradación del ADN. Estos telómeros están compuestos por múltiples repeticiones en tándem de secuencias cortas de nucleótidos no codificantes (62,63).

#### **3.7.4 Arqueas**

Las arqueas son organismos unicelulares que se parecen mucho a las bacterias cuando se observan bajo microscopio óptico y electrónico. Al igual que las bacterias, suelen tener un único cromosoma circular y carecen de núcleo. Durante mucho tiempo, las arqueas fueron clasificadas erróneamente como bacterias. El primer indicio de que las arqueas podrían constituir un dominio separado se obtuvo a partir de análisis filogenéticos del gen 16S rRNA. Los avances en la secuenciación y análisis del genoma proporcionaron más evidencia de la distinción evolutiva entre los dominios bacterianos y arqueas. A pesar de su similitud con las bacterias, las arqueas comparten muchas similitudes a nivel molecular con los eucariotas.

Las arqueas exhiben una combinación única de características bacterianas, eucariotas y específicas de las arqueas. Su pared celular es química y estructuralmente diversa, sin embargo, de manera sistemática, carecen de peptidoglicano, como la mureína, presente en la mayoría de las bacterias (64-66).

#### **3.7.5 Expresión génica**

La regulación de la expresión génica es crucial para la diversidad y el funcionamiento celular, así como para la organización de los órganos humanos. Aunque las células humanas comparten secuencias de ADN casi idénticas, sus funciones difieren ampliamente. Esto se logra principalmente mediante la transcripción y traducción de los genes, procesos fundamentales para la transferencia de información del genotipo al fenotipo. El control preciso de estos mecanismos es vital para el correcto funcionamiento de todos los organismos. Los elementos genéticos encargados de regular la expresión génica, denominados elementos reguladores, suelen ser secuencias presentes en el ácido desoxirribonucleico (ADN) o el ácido ribonucleico (ARN). De este modo, la información reguladora puede influir directamente en la secuencia de ácido nucleico (67,68).

#### **3.7.6 Regulación transcripcional**

La transcripción del ADN es el proceso químico mediante el cual la información genética contenida en el ADN se transfiere al ARN. El ARN resultante puede desempeñar una función biológica específica o ser parte de una clase intermedia de ARN conocida como ARN mensajero (ARNm), junto con otras moléculas

de ARN como el ARN de transferencia (ARNt) y el ARN ribosomal (ARNr). Estas moléculas de ARN son componentes esenciales de la maquinaria celular utilizada para la síntesis de proteínas. El flujo de información genética desde el ADN hasta el ARN y luego hacia las proteínas es un proceso fundamental presente en todos los organismos vivos. No obstante, es importante destacar que la transferencia de información no es exclusivamente unidireccional. La enzima transcriptasa inversa tiene la capacidad de transferir información genética desde el ARN al ADN, lo que tiene implicaciones importantes en diversos procesos biológicos (69).

El modelo básico de regulación transcripcional implica la unión de proteínas reguladoras, conocidas como factores transcripcionales (FT), a secuencias específicas de ADN en regiones denominadas módulos reguladores (MR). Los Factores transcripcionales son productos proteínicos sujetos a la regulación de la expresión génica. Los módulos reguladores se definen por la secuencia primaria de ADN a la que se unen los factores transcripcionales, determinando así su función en el proceso de expresión génica. Uno de los tipos de módulos reguladores más comunes son los promotores, que consisten en motivos específicos de ADN necesarios para la transcripción del ARN tanto en procariotas como en eucariotas. Estos promotores se unen a la maquinaria transcripcional basal, incluyendo la ARN polimerasa y los factores transcripcionales generales. Los enhancers, por otro lado, son módulos reguladores que se asocian con proteínas activadoras y aumentan la afinidad de la ARN polimerasa hacia la región promotora, facilitando así la transcripción de genes específicos o conjuntos de genes. Los enhancers suelen estabilizar la unión de la ARN polimerasa mediante modificaciones estructurales en las histonas. Por último, los silenciadores son elementos reguladores que, al unirse a proteínas represoras, inhiben la transcripción de genes al bloquear la actividad de la ARN polimerasa (69,70).

### **3.8 Análisis microbianos moleculares de nueva generación**

Los análisis microbianos moleculares de nueva generación representan técnicas avanzadas que posibilitan la exploración más exhaustiva y precisa de la diversidad, estructura y función de las comunidades microbianas en comparación con los métodos convencionales. Estas técnicas se fundamentan en tecnologías de secuenciación de ADN de alto rendimiento, como la secuenciación masiva o de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés), que permiten analizar grandes volúmenes de datos genómicos de forma simultánea. Estas innovadoras técnicas ofrecen numerosas ventajas respecto a los enfoques tradicionales, como una mayor resolución taxonómica y funcional, la capacidad de detectar microorganismos en muestras ambientales complejas y la habilidad para identificar especies no cultivables en el laboratorio. Además, los análisis microbianos de nueva generación pueden proporcionar valiosa información sobre la diversidad genética, la estructura de las comunidades microbianas, las interacciones entre microorganismos y su contribución a procesos ecológicos y biogeoquímicos (71).

### **3.8.1 Preómica**

Han surgido técnicas moleculares para la identificación microbiana que aprovechan la genómica, superando así las limitaciones asociadas al cultivo. Estas técnicas, en su mayoría, se basan en el gen del ARN ribosómico 16S (16S rRNA), el cual puede ser analizado después de la extracción del ADN bacteriano. El ARNr 16S contiene regiones altamente conservadas que permiten la orientación de cebadores universales hacia todas las bacterias, intercaladas con regiones hipervariables específicas de cada especie. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores universales diseñados para las regiones conservadas puede amplificar los amplicones de ARNr 16S de una amplia diversidad de especies bacterianas. Mediante la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante, se pueden discriminar estas especies basándose en sus distintos comportamientos de fusión de secuencias de ARNr 16S, evidenciados en un gel de poliacrilamida. A pesar de que el gen 16S rRNA ha sido el marcador filogenético más utilizado para el estudio de comunidades microbianas orales durante casi dos décadas, se han identificado limitaciones. Por ejemplo, las técnicas basadas en PCR, incluida la PCR cuantitativa en tiempo real, solo han podido sondear hasta 10 especies de los cientos presentes en la comunidad microbiana oral. Además, la electroforesis en gel no es una técnica cuantitativa y simplemente puede diferenciar algunos taxones en una muestra determinada (72,73).

### **3.8.2 Secuenciación**

La secuenciación de ADN es el proceso que permite determinar el orden exacto de los nucleótidos que conforman una molécula de ADN. Estos nucleótidos, también llamados bases nitrogenadas, incluyen adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G). Este procedimiento es esencial para comprender la información genética almacenada en un organismo, dado que la secuencia de nucleótidos en el ADN codifica la información necesaria para la síntesis de proteínas y para el funcionamiento de los procesos celulares (71).

### **3.8.3 Metagenómica**

La metagenómica es una disciplina de la biología molecular que se dedica al estudio del material genético colectivo obtenido directamente de muestras ambientales, como suelos, aguas, sedimentos e incluso el microbioma humano, sin necesidad de cultivar los microorganismos presentes en ellas. A diferencia del enfoque tradicional de analizar organismos o comunidades microbianas individualmente, la metagenómica examina todo el conjunto de material genético presente en una muestra, lo que permite estudiar la diversidad y la función de los microorganismos de manera integral. Los métodos

metagenómicos implican la extracción de ADN o ARN de la muestra ambiental, seguido de la secuenciación masiva del material genético obtenido. Luego, se emplean técnicas bioinformáticas avanzadas para analizar y comparar las secuencias obtenidas con bases de datos genómicas, con el fin de identificar genes, especies y funciones biológicas presentes en la muestra (71).

### 3.8.4 Metaómica integrada

Los análisis convencionales de conjuntos de datos ómicos generalmente se centran en la estructura o las funciones de la comunidad. Sin embargo, desentrañar la compleja red de interacciones entre las entidades constituyentes sigue siendo un desafío importante. En el complejo ecosistema oral, comprender la naturaleza y la dinámica de la enfermedad requiere un enfoque multifacético que incluye la evaluación taxonómica (composición), las funciones potenciales (metagenoma), las funciones activas (metatranscriptoma) y las funciones codificadas (metaproteoma y metaboloma) (Durán-Pinedo y Frías-López, 2015). Aunque cada enfoque proporciona información valiosa por separado, su análisis integrado es significativamente más valioso que la suma de sus partes para lograr una comprensión integral de la naturaleza y la dinámica de la enfermedad (71,74,75).

## 3.9 Nanopore

La tecnología Nanopore es una técnica de secuenciación de ADN de tercera generación que permite la lectura directa de moléculas de ácidos nucleicos mediante el paso de estas a través de un poro nanométrico, sin necesidad de amplificación previa. A medida que las bases nitrogenadas atraviesan el poro, se generan cambios en la corriente iónica que son interpretados en tiempo real por un sistema computacional, permitiendo la determinación de la secuencia de bases. Esta tecnología destaca por su capacidad para producir lecturas ultra largas, portabilidad de los dispositivos y rapidez en la obtención de resultados, lo que la hace especialmente útil en estudios metagenómicos, de genómica estructural y diagnóstico clínico (76).

### 3.9.1 NanoDrop

El **NanoDrop** es un espectrofotómetro de microvolumen utilizado para la cuantificación y evaluación de la pureza de ácidos nucleicos (ADN y ARN) y proteínas. Funciona mediante espectrofotometría UV-Vis, midiendo la absorbancia de la muestra a diferentes longitudes de onda, principalmente a 260 nm y 280 nm, que corresponden a los picos de absorción del ADN y de las proteínas, respectivamente. A través de estas mediciones, se puede estimar la concentración y la pureza del material genético, siendo una herramienta rápida, precisa y que requiere volúmenes mínimos (tan solo 1–2 µL), lo cual es ideal para aplicaciones en biología molecular, genética y genómica (77).

### 3.9.2 Electroforesis

La **electroforesis** es una técnica de laboratorio utilizada para la separación y análisis de moléculas cargadas, como ácidos nucleicos (ADN y ARN) o proteínas, en función de su tamaño y carga eléctrica. Este proceso se lleva a cabo aplicando un campo eléctrico a través de un gel poroso, generalmente de agarosa o poliacrilamida, lo que permite que las moléculas migren a diferentes velocidades dependiendo de sus características fisicoquímicas. En biología molecular, la electroforesis en gel de agarosa es una herramienta fundamental para verificar la integridad del ADN, estimar su tamaño y evaluar productos de amplificación como los obtenidos en una PCR (78).

### 3.9.3 Barcode

El código de barras genético (o *DNA barcode*) es una herramienta molecular utilizada para la identificación de especies mediante el análisis de una corta región estandarizada del genoma. En bacterias se emplean regiones del gen 16S rRNA. Esta técnica permite diferenciar organismos a nivel taxonómico con alta precisión, facilitando estudios de biodiversidad, control de calidad en productos biológicos, análisis ambientales y caracterización de microbiotas. El código de barras genético es fundamental en enfoques como el **metabarcoding**, donde se secuencian múltiples barcodes simultáneamente para identificar comunidades microbianas complejas (79).

### 3.9.4 Proname

**PRONAME** (*Pipeline for the Robust ONtological Analysis of MEtabarcoding data*) es una herramienta bioinformática diseñada específicamente para el procesamiento, análisis y visualización de datos de secuenciación de tercera generación, como los generados por plataformas Oxford Nanopore. Este software integra múltiples etapas del análisis de datos metagenómicos, incluyendo filtrado de secuencias, control de calidad, asignación taxonómica y generación de salidas gráficas interactivas. PRONAME se destaca por su capacidad de manejar lecturas largas, permitiendo trabajar con regiones completas del gen 16S rRNA, y por su compatibilidad con archivos en formato *fastq* y bases de datos taxonómicas especializadas (80).

### 3.9.4 NanoPlot

NanoPlot es una herramienta bioinformática diseñada para la visualización y evaluación de datos de calidad derivados de tecnologías de secuenciación de tercera generación, como Oxford Nanopore

Technologies. Este software permite generar representaciones gráficas detalladas que facilitan el análisis exploratorio de las lecturas crudas en archivos *fastq* o *bam*, incluyendo histogramas de longitudes de lectura, diagramas de densidad, gráficos de calidad por posición y diagramas bivariantes que relacionan longitud, calidad y rendimiento de las secuencias. NanoPlot resulta esencial en los flujos de trabajo de control de calidad, ya que permite identificar rápidamente sesgos o problemas técnicos antes del análisis downstream, asegurando la integridad y confiabilidad de los datos de secuenciación (80,81).

### 3.9.5 Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs)

Las Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs, por sus siglas en inglés *Operational Taxonomic Units*) son agrupaciones de secuencias de ADN que comparten un alto grado de similitud, comúnmente utilizadas como proxy para representar especies o grupos taxonómicos en estudios de biodiversidad microbiana. En análisis metagenómicos y de metabarcoding, las OTUs se definen mediante umbrales de identidad genética, usualmente del 97 %, lo que permite clasificar secuencias similares sin necesidad de una identificación taxonómica formal. Este enfoque ha sido ampliamente adoptado para evaluar la composición, estructura y diversidad de comunidades microbianas en diferentes entornos, facilitando el análisis comparativo entre muestras y condiciones experimentales (82).

### 3.9.6 Números Hill

Los números de Hill, también conocidos como números de diversidad o diversidad de Hill, son una familia de índices que permiten cuantificar la diversidad biológica de una comunidad considerando tanto la riqueza de especies como la equitatividad en sus abundancias. Estos números están parametrizados por un valor  $q$ , el cual determina la sensibilidad del índice a las especies raras o dominantes. Cuando  $q=0$ , el número de Hill corresponde simplemente a la riqueza de especies (todas las especies se consideran por igual); cuando  $q=1$ , equivale al exponencial del índice de Shannon el cual es un estimador de diversidad, ponderando las especies por su abundancia relativa; y cuando  $q=2$ , se aproxima al inverso del índice de Simpson, dando mayor peso a las especies dominantes. Esta formulación proporciona una visión unificada y comparativa de la diversidad, útil en estudios microbiológicos y metagenómicos (83).

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

- Identificar los microorganismos presentes en los microbiomas asociados a tratamientos endodónticos que han fracasado, mediante el análisis de comunidades microbianas utilizando técnicas de *metabarcoding*.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Caracterizar la diversidad de los microorganismos identificados a través de los análisis de metabarcoding de 6 muestras de dientes con periodontitis apical secundaria asintomática.
- Evaluar la abundancia relativa de cada microorganismo identificado en los microbiomas asociados con tratamientos endodónticos fallidos.
- Determinar si existe un perfil microbiológico característico que pueda ser utilizado como herramienta diagnóstica en casos de periodontitis apical secundaria asintomática.

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1 TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO**

El presente estudio correspondió a un tipo de estudio piloto con diseño transversal, observacional, descriptivo e *in vivo*, realizado en dientes con diagnóstico de periodontitis apical secundaria asintomática. Se llevó a cabo un análisis de las muestras obtenidas del sistema de conductos radiculares mediante secuenciación de metabarcoding con tecnología **Nanopore®**.

### **5.2 ÁREA DE ESTUDIO**

El estudio se desarrolló en la Escuela de Odontología de la Universidad del Valle, ubicada en la ciudad de Cali Valle. Esta institución académica y clínica cuenta con servicios especializados en diferentes ramas de la odontología, incluyendo el Posgrado de Endodoncia, donde específicamente fue que se llevó a cabo la recolección de los pacientes.

### **5.3 POBLACIÓN OBJETIVO**

La población Objetivo de este estudio estuvo constituida por pacientes que asistieron a la Escuela de Odontología de la Universidad del Valle y que fueron remitidos al servicio del Posgrado de Endodoncia con necesidad de retratamiento endodóntico como parte de su tratamiento definitivo durante el período comprendido entre noviembre del 2024 y marzo del 2025

### **5.4 POBLACION DE ESTUDIO**

La población de estudio estuvo conformada por los pacientes remitidos a la clínica del servicio de Posgrado de Endodoncia para retratamiento endodóntico y con diagnóstico de periodontitis apical asintomática. Posteriormente, se realizó un examen clínico inicial, donde se presentó el proyecto a cada paciente que deseó participar, se le explicó que su participación era voluntaria, así como, objetivos y desarrollo de la investigación a realizar.

#### **5.4.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN**

##### **5.4.1.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Dientes que presenten como diagnóstico pulpar tratamiento endodóntico previo que requieran retratamiento endodóntico, y que presentan periodontitis apical secundaria.

##### **5.4.1.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Pacientes con enfermedades sistémicas graves ASA4.

- Pacientes en estado de embarazo o lactancia.
- Pacientes que hayan utilizado tratamiento con antibióticos en los últimos 30 días.
- Pacientes que hayan participado en otro estudio clínico durante los 3 meses anteriores.
- Dientes que no puedan aislarse fácilmente con dique de goma.
- Dientes con presencia de postes intrarradiculares.
- Pacientes a los cuales no se les pueda desobturar el canal radicular en 1 sola cita.

## 5.5 DISEÑO DE MUESTREO

Se utilizó un muestreo no probabilístico por conveniencia, seleccionando a los pacientes que acudieron a la clínica del servicio de Posgrado de Endodoncia durante el período de estudio comprendido entre noviembre del 2024 y marzo del 2025 con diagnóstico de periodontitis apical asintomática. La muestra estuvo conformada por aquellos pacientes que cumplían con los criterios de inclusión establecidos previamente.

### 5.5.1 CALCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA

En el presente estudio se incluyeron seis (6) muestras correspondientes a 6 pacientes distintos diagnosticados con periodontitis apical asintomática, seleccionados de los procedimientos clínicos realizados en el Posgrado de Endodoncia de la Universidad del Valle. Los pacientes incluidos cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión establecidos, y la recolección de muestras se llevó a cabo durante dos semestres académicos, iniciando en noviembre de 2024 y finalizado en marzo del 2025.

## 5.6 DEFICIÓN DE VARIABLES

### 5.6.1 DEFINICIÓN DE LA VARIABLE PENDIENTE

**Diversidad Microbiana:** Es la variedad y abundancia relativa de diferentes especies microbianas (tanto cultivables como no cultivables) presentes en el microbioma del conducto radicular. Esta variable refleja el grado de complejidad y heterogeneidad del ecosistema microbiano en dicha región anatómica. Se considera dependiente porque varía en función de la composición del microbioma, es decir, de los tipos específicos de microorganismos presentes.

### 5.6.1.2 CUADRO OPERACIONAL DE LAS VARIABLES

**Tabla 1. Definición operacional de variables.**

| Variable                      | Definición operacional                                                                                                                           | Tipo/nivel de medición   | Valores posibles                                                                                            |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Composición microbioma</b> | Tipos específicos de microorganismos presentes en el microbioma del conducto radicular                                                           | Cualitativa<br>Nominal   | Nombres de los microorganismos encontrados según su material genético                                       |
| <b>Diversidad Microbiana</b>  | Variedad y abundancia relativa de diferentes especies microbianas cultivables y no cultivables presentes en el microbioma del conducto radicular | Cuantitativa<br>Continua | Expresada por medio de especies microbianas presentes, representadas en porcentajes relativos de abundancia |

## 5.7 PROCESO DE EXTRACCIÓN, PREPARACIÓN DE LAS BIBLIOTECAS DE ADN Y ANÁLISIS

El procedimiento de análisis genético se inició con la conservación de las muestras biológicas, las cuales fueron almacenadas en tubos Eppendorf a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  con el fin de evitar su degradación y preservar la integridad del material genético. Posteriormente, se realizó la extracción del ADN utilizando el kit ZymoBIOMICS DNA, lo que permitió obtener ADN de alta calidad apto para los análisis posteriores. A continuación, se efectuó la evaluación de la calidad del ADN mediante la cuantificación con NanoDrop y la amplificación del gen 16S rRNA por PCR, garantizando la pureza y adecuación del material para la secuenciación. Una vez verificada su calidad, se llevó a cabo la amplificación de regiones variables (V1–V9) del ADN, con el propósito de aumentar la cantidad de fragmentos representativos del genoma microbiano. Se procedió a la preparación de bibliotecas de ADN utilizando el kit de ligación Nanopore, siguiendo las recomendaciones del fabricante para garantizar la eficiencia de la secuenciación. Las muestras amplificadas fueron sometidas a un proceso de agrupación en proporciones equimolares, con el fin de asegurar una representación balanceada de cada muestra dentro del análisis global. Finalmente, las bibliotecas preparadas fueron sometidas al proceso de secuenciación en modalidad single-end,

empleando la tecnología Nanopore, la cual permite obtener lecturas de alta longitud y precisión, esenciales para el análisis metagenómico.

El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas se llevó a cabo mediante un flujo de trabajo estructurado en diferentes etapas, orientado a garantizar la calidad y precisión en la identificación de los taxones presentes en las muestras. En primer lugar, se realizó el filtrado de lecturas, eliminando aquellas de baja calidad y seleccionando únicamente las secuencias con una longitud comprendida entre 1300 y 1600 pares de bases, con el fin de asegurar la fiabilidad de los datos. Posteriormente, se efectuó la eliminación de quimeras mediante el software VSEARCH, lo que permitió descartar las secuencias artefactuales generadas durante la amplificación por PCR.

Las secuencias depuradas fueron sometidas a la agrupación en unidades taxonómicas operativas (OTUs), considerando un umbral de similitud superior al 80 % y una calidad mayor a 7, con el propósito de agrupar los fragmentos genéticos que representan especies o grupos microbianos similares. A continuación, se llevó a cabo la asignación taxonómica utilizando la herramienta REGEN-B, que permitió asociar cada OTU con su correspondiente nombre taxonómico según las bases de datos de referencia. Se aplicó un análisis de estadística descriptiva de abundancia, basado en los índices de riqueza y diversidad de Shannon y Simpson, expresados mediante números de Hill y representados a través de curvas de acumulación. Para el análisis comparativo de la abundancia entre muestras, se utilizaron frecuencias relativas y para el procesamiento, visualización (gráficos) y análisis de los resultados se utilizaron diversos paquetes de datos R, entre los que se incluyeron: **phyloseq**, **qiime2R**, **ggplot2**, **RColorBrewer**, **fantaxtic**, **iNEXT** y **dplyr**.

## 5.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS

En el contexto de esta investigación, se aplicaron los principios establecidos en el Código de Núremberg como una guía fundamental, estos principios, surgidos como respuesta a experimentos inhumanos llevados a cabo durante la Segunda Guerra Mundial, destacaban la importancia del consentimiento informado, la minimización de riesgos y la garantía de la voluntariedad de la participación de los sujetos en cualquier estudio.

Este estudio fue una investigación *in vivo* en las clínicas del posgrado de endodoncia y laboratorios de Microbiología de la Universidad del Valle, siguiendo los lineamientos de ética descritos en la resolución número 8430 de 1993 la cual fue emitida por el ministerio de salud colombiano estableciendo normas científicas, técnicas, administrativas y disposiciones relacionadas con la investigación en salud, así como la ética de los estudios de investigación en seres humanos.

Esta investigación experimental de acuerdo a la resolución 8430 de 1993, en el artículo 11 del título II,

**Capítulo I** se clasificó como una investigación de **riesgo mínimo** ya que se realizaron procedimiento de recolección de muestras del conducto radicular de pacientes los cuales pudieron estar en contacto con saliva y sangre los cuales fueron llevados a investigación microbiológica.

El estudio se ajustó a las normativas éticas y legales vigentes, así como a las directrices del comité de ética de la universidad del valle. Finalmente, este estudio obtuvo la aprobación formal del comité de CEIS de la universidad del valle a través del código (059-024) antes de iniciar el trabajo de campo.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 SECUENCIACIÓN

La fusión de las lecturas *paired-end* fueron un total de **31.257 lecturas**, distribuidas entre las seis muestras analizadas (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Características de las muestras según sexo, diente de la lesión, edad del paciente, lecturas simples y apareadas de alta calidad.

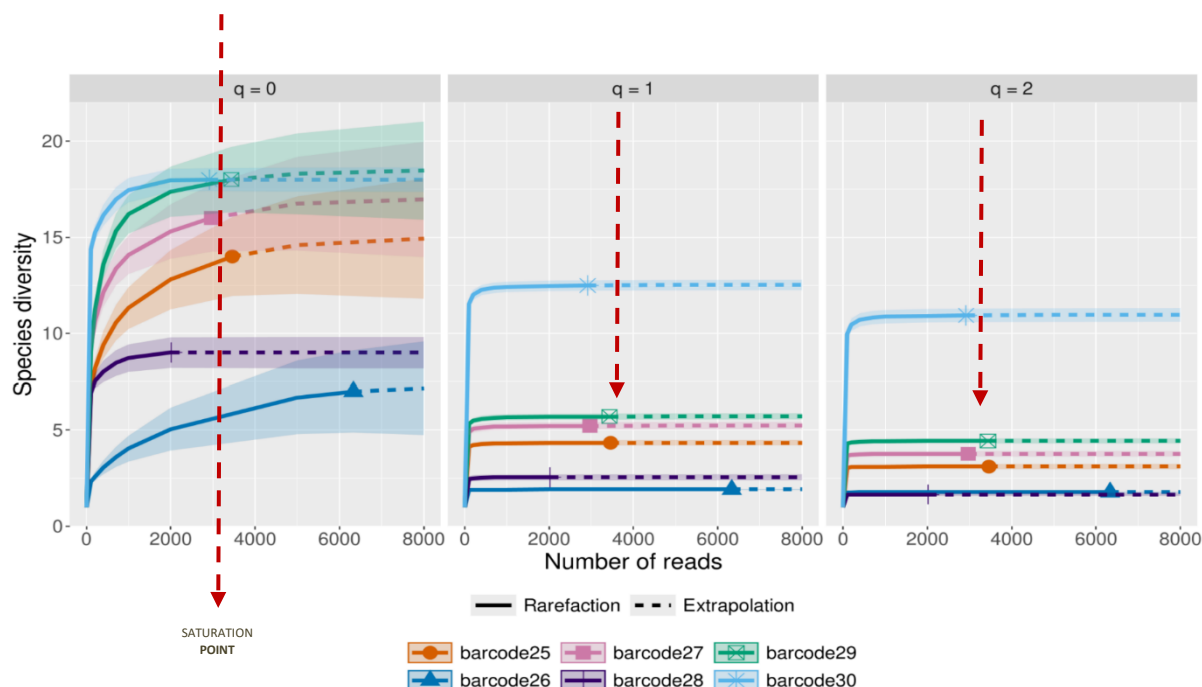
| Muestra                                                                                                                       | Código     | Sexo | Diente | Edad del paciente (años) | Lecturas simples de alta calidad | Lecturas apareadas de alta calidad |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------|--------|--------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| ME001                                                                                                                         | Barcode 25 | F    | 25     | 58                       | 4758                             | 17                                 |
| ME002                                                                                                                         | Barcode 26 | M    | 11     | 42                       | 7934                             | 5                                  |
| ME003                                                                                                                         | Barcode 27 | F    | 25     | 55                       | 4609                             | 12                                 |
| ME004                                                                                                                         | Barcode 28 | M    | 14     | 42                       | 2712                             | 18                                 |
| ME005                                                                                                                         | Barcode 29 | M    | 24     | 44                       | 6170                             | 53                                 |
| ME006                                                                                                                         | Barcode 30 | M    | 23     | 58                       | 4965                             | 4                                  |
| <i>M: masculino - F: femenino</i><br><i>Lecturas simples de alta calidad (HQ_simplex_reads) y apareadas (HQ_duplex_reads)</i> |            |      |        |                          |                                  |                                    |

### 6.2 RIQUEZA Y DIVERSIDAD

**6.2.1 Riqueza:** En el grafico se observa índice de riqueza de Chao (**Figura 4 q = 0**) que expresa la totalidad de la población microbiana identificada en número de lecturas (eje X) y el número de especies (eje Y) de las seis muestras evaluadas. Se observa que la muestra *Barcode 29* y *Barcode 30* alcanzaron una asíntota aproximadamente de 17 especies que cubrió la región secuenciada, a diferencia del *Barcode 27* que alcanzó aproximadamente 16 especies, seguido del *Barcode 25* con 14 especies, *Barcode 28* con 9 especies y *Barcode 26* con 7 especies, indicando así, que las muestras con mayor riqueza fueron el *Barcode 29* y *Barcode 30* y la muestra menos rica fue el *Barcode 26*.

**6.2.2 Diversidad:** El índice de diversidad de Shannon (**Figura 4 q = 1**) toma en cuenta las especies con diversidad o frecuencia media, por lo tanto, nos indica que el *Barcode 30* se ajusta a tener aproximadamente 12 especies siendo el más diverso, a diferencia del *Barcode 26* en el que se identifican aproximadamente 2 especies, siendo esta la menos diversa. En el *Barcode 29* se evidencian aproximadamente 6 especies, seguido del *Barcode 27* con 5 especies, *Barcode 25* con 4 especies y *Barcode 28* con 3 especies, respectivamente.

El índice de diversidad de Simpson (**Figura 4 q = 2**) toma en cuenta las especies más abundantes o dominantes y nos indica que el *Barcode 30* sigue siendo el más diverso identificando aproximadamente 11 especies, a diferencia del *Barcode 28* y *Barcode 26* expresando ser los menos diversos con aproximadamente 1 especie dominante. El *Barcode 29* se ajusta a tener aproximadamente 4 especies, seguido del *Barcode 27* con 3 especies y *Barcode 25* con 2 especies.



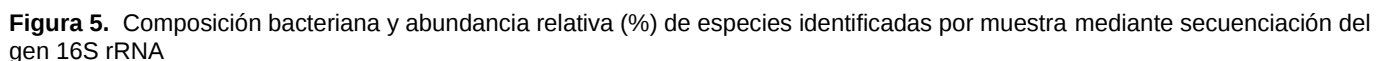
**Figura 4.** Curva de rarefacción del número de especies observadas o Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU), en función del número de lecturas analizadas según Chao ( $q = 0$ ), Shannon ( $q = 1$ ) y Simpson ( $q = 2$ ).

### 6.3 COMPOSICIÓN TAXONOMICA DE LA MICROBIOTA

La composición de la microbiota analizada en las seis muestras ("*barcode25*" a "*barcode30*") mostró una diversidad taxonómica significativa, con predominancia de especies bacterianas pertenecientes a distintos grupos filogenéticos, principalmente de los filos ***Firmicutes***, ***Bacteroidetes***, ***Fusobacteria*** y ***Actinobacteria***.

- *Streptococcus oralis* subsp. *tigurinus*
- *Veillonella parvula*
- *Fusobacterium nucleatum*
- *Lactobacillus gasseri*
- *Selenomonas sputigena*
- *Eubacterium* sp. y *Eubacterium limosum*

La muestra **barcode25** exhibió alta diversidad y abundancia de *Lactobacillus* y *Streptococcus* sp., mientras que **barcode26** se caracterizó por una mayor presencia de *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus* sp. **Barcode27** presentó un perfil con mayor prevalencia de *Tannerella forsythia* y *Prevotella massiliasp*, mientras que **barcode28** predominó la *Pyramidobacter piscolens*. **Barcode29** predominó el *Enterococcus faecalis*, *Lacticaseibacilluszeae*, y **barcode30** evidenció una mayor diversidad, con predominio de la especie *Fretibacterium fastidiosum* (Figura 5).



## 7. DISCUSIÓN

En la actualidad, las tecnologías de secuenciación de tercera generación han optimizado la evaluación de la composición bacteriana, permitiendo una caracterización más precisa de las comunidades microbianas y, en consecuencia, una mejor comprensión del papel que desempeñan los microorganismos en la patogénesis de la periodontitis apical (84). En el presente estudio se utilizó la secuenciación de los fragmentos de ADN del gen del ARN ribosomal 16S, abarcando las regiones variables V1 a V9, con el propósito de caracterizar la diversidad taxonómica en casos de periodontitis apical secundaria y analizar los patrones clínicos relacionados con la estructura de la comunidad microbiana (85,86). La secuenciación fue realizada mediante la tecnología de tercera generación Nanopore, desarrollada por Oxford Nanopore Technologies®. En este contexto, diversos estudios previos han empleado la tecnología de secuenciación Illumina con etiquetado mediante códigos de barras, utilizando plataformas basadas en pirosecuenciación, con el objetivo de analizar la diversidad microbiana de manera precisa y reproducible (87). Aunque la plataforma de secuenciación Illumina representa una mejora significativa en comparación con otros métodos para evaluar la composición bacteriana, se distingue por una baja tasa de error, que varía entre el 0.1 % y el 1 %. Esta tecnología se caracteriza por generar lecturas cortas de ADN, favoreciendo una alta precisión y reproducibilidad en los estudios microbiológicos (88). La tecnología de secuenciación por nanoporos, desarrollada por Oxford Nanopore Technologies®, ha revolucionado el análisis genómico al posibilitar la lectura directa de moléculas de ADN sin la necesidad de pasos previos de amplificación (89,90). Una de sus principales ventajas es su capacidad para generar lecturas ultra largas, que en condiciones óptimas pueden superar el millón de pares de bases, lo que favorece el ensamblaje de genomas complejos y la identificación de variantes estructurales. No obstante, esta tecnología presenta una tasa de error relativamente alta en comparación con plataformas basadas en secuenciación por síntesis, como Illumina (90,91). Aunque los avances recientes han incrementado significativamente la precisión, los errores pueden oscilar entre el 2 % y el 10 %, particularmente en regiones con repeticiones homopoliméricas o estructuras secundarias complejas (92). En el presente estudio se empleó la tecnología de secuenciación **Nanopore®** con estrategia metabarcoding, en lugar del sistema **Illumina Miqseq®**, debido a que Nanopore permite obtener lecturas largas de ADN, que oscilan entre 10.000 y 30.000 nucleótidos, mediante lecturas sencillas (simplex) y dobles (dúplex) (80,90). Esta característica posibilita la secuenciación completa del gen ribosomal 16S, lo que ofrece una mayor resolución taxonómica. En contraste, el sistema Illumina genera lecturas cortas, aproximadamente entre 150 y 300 (88), lo que representa una limitación para diferenciar ciertos microorganismos y evaluar con precisión su diversidad. Finalmente, se optó por emplear lecturas simples, ya que, a pesar de presentar una mayor probabilidad de errores en comparación con las lecturas dobles, permiten corregir los errores y definir la variabilidad taxonómica (80).

La caracterización taxonómica realizada evidenció una composición bacteriana heterogénea entre las seis muestras analizadas, lo que pone de manifiesto una variabilidad microbiana (93–96). Esta diversidad puede estar relacionada con diferencias fisiológicas o clínicas entre los individuos, en diferentes contextos de salud y enfermedad (46,47,50,54,86).

Los principales taxones identificados en las muestras analizadas pertenecen a los filos **Firmicutes**, **Fusobacteria**, **Bacteroidetes** y **Actinobacteria**, los cuales han sido comúnmente reportados en la literatura como asociados a la microbiota presente en lesiones endodónticas (97–100). Dentro de estos grupos, la detección conjunta de especies como *Streptococcus oralis*, *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum* y *Lactobacillus gasseri* fue consistente en múltiples muestras, siendo particularmente relevantes para este estudio debido a que su presencia sugiere la existencia de un microbioma complejo y equilibrado; característico de **entornos** microbianos maduros o clínicamente estables (99,100).

La muestra **Barcode25** presentó una baja diversidad, con predominio aproximadamente de 2 especies dominantes del género *Lactobacillus* y *Streptococcus sp.*, ambas comúnmente asociadas a la microbiota oral e implicadas en procesos de caries y desmineralización contribuyendo a la progresión de la lesión (Santos et al., 2021) (101). El **Barcode 26**, también mostro una baja diversidad conformada aproximadamente por 1 especie dominante correspondiente al género *Enterococcus faecalis*, una especie ampliamente vinculada a infecciones endodónticas persistentes debido a su capacidad de sobrevivir en condiciones desfavorables y resistir tratamientos antimicrobianos (Barbosa-Ribeiro et al., 2016-2024; Jhajharia et al., 2015) (102–104). La muestra **Barcode27** destacó la prevalencia de *Tannerella forsythia* y *Prevotella massilia sp.*, especies asociadas a condiciones anaerobias crónicas y a la progresión de infecciones periodontales y endodónticas como fue reportado por (Siqueira & Rôças, 2009) (105). El **Barcode 28** evidenció la presencia de *Pyramidobacter piscolens*, un microorganismo del filo *Synergistetes* que ha sido identificado en infecciones mixtas de difícil resolución o en desequilibrios biológicos, especialmente en casos de fracaso endodóntico (Downes et al., 2009) (106). **Barcode29**, predominó *Enterococcus faecalis* junto a *Lacticaseibacillus zae*, que, en el contexto endodóntico, aunque no son agresivas por si solas, pueden causar infección si se encuentran en un ambiente favorable dentro de un diente afectado, desencadenando así, la no resolución de la patología perirradicular como fue reportado por (Sedgley et al., 2006) (107). Finalmente, el **Barcode 30** mostró una composición más diversa, destacándose la presencia dominante de *Fretibacterium fastidiosum*, bacteria recientemente relacionada con procesos inflamatorios crónicos y con el agravamiento de lesiones apicales (Isabela N. Rocas et al., 2014) (108).

En el presente estudio, se identificó al filo Bacillota (anteriormente conocido como Firmicutes) como el grupo bacteriano con mayor prevalencia en las muestras analizadas, hallazgo que concuerda con investigaciones previas. Siqueira y Rôças (2003) describieron a *Parvimonas alactolytica*, un bacilo Gram

positivo y anaerobio estricto pertenecientes al filo Firmicutes, como una de las especies más frecuentes en este tipo de infecciones (109). En una investigación posterior, Siqueira et al. (2016) realizaron un análisis clonal del gen 16S rRNA en muestras de diez conductos radiculares, identificando 689 clones que correspondieron a 76 filotipos distintos. Dicho análisis evidenció una comunidad microbiana compleja, donde Firmicutes representó el filo más predominante (43.5 %), seguido por Bacteroidetes (22.5 %) y Proteobacteria (13.2 %), de manera consistente (110). Abraham et al. (2024) analizaron 20 conductos radiculares mediante secuenciación masiva del gen 16S rRNA, obteniendo más de 5.3 millones de lecturas, y reportaron que Firmicutes fue el filo dominante tanto en infecciones primarias (32.2 %) como en casos postratamiento (54.4 %). Este incremento en la proporción de Firmicutes tras el tratamiento endodóntico podría reflejar una selección microbiana inducida por la intervención clínica (111).

En particular, se destacó la presencia de *Enterococcus faecalis*, una especie perteneciente a este filo conocida por su resistencia y relevancia clínica, cuya frecuencia fue significativamente mayor en conductos previamente tratados, lo que refuerza su papel en las infecciones endodónticas persistentes (102–104,112).

En el presente estudio, se detectó consistentemente la presencia de bacterias del género *Clostridia* en todas las muestras analizadas (n=6), lo cual sugiere una distribución constante y potencialmente relevante de este grupo dentro del ecosistema microbiano de las infecciones endodónticas. Henriques et al. (2016), quienes identificaron *Clostridium difficile*, un miembro clínicamente significativo de la clase *Clostridia*, en conductos radiculares que no respondieron al tratamiento endodóntico. En dicho estudio, se analizaron 40 muestras mediante amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) e hibridación con 107 sondas específicas, detectando a *C. difficile* con una frecuencia promedio del 2.74 %. La persistencia de *Clostridia* podría estar relacionada con su capacidad de sobrevivir en ambientes anaerobios extremos como los conductos radiculares infectados (54); formando un microbioma resistente y difícil de erradicar en infecciones endodónticas crónicas o recurrentes (113). Por tanto, su identificación debe ser considerada en futuras estrategias diagnósticas y terapéuticas, especialmente en casos clínicamente refractarios al tratamiento convencional (114).

En el **Barcode 28**, se identificó una alta abundancia de la especie *Pyramidobacter piscolens*, perteneciente al género *Synergistia* del filo **Synergistota** (anteriormente denominado *Synergistetes*), lo cual reviste especial relevancia dada su afinidad por ambientes estrictamente anaerobios. No obstante, gracias al uso de técnicas moleculares como la secuenciación del gen 16S rRNA, se ha logrado documentar su presencia en casos de infecciones endodónticas secundarias (94). En este sentido, Sánchez-Sanhueza et al. (2018) reportaron que *P. piscolens* (OTU7) fue uno de los microorganismos dominantes en agrupaciones correspondientes a infecciones endodónticas secundarias, incluso en casos asintomáticos con periodontitis apical secundaria. Estos autores señalaron que *P. piscolens* no es

exclusivo de formas clínicas sintomáticas, ya que su presencia también es frecuente en infecciones persistentes sin sintomatología evidente. Este hallazgo reviste importancia clínica y microbiológica, ya que los miembros de este filo han sido históricamente difíciles de cultivar mediante métodos tradicionales, lo que ha limitado su caracterización a través del tiempo; sin embargo, su detección en este estudio sugiere que *Pyramidobacter piscoles* podría desempeñar un papel activo en la estructura y estabilidad del microbioma asociado a infecciones endodónticas secundarias, independientemente de la expresión clínica del paciente (93).

Los hallazgos obtenidos en este estudio evidencian que la caracterización del microbioma mediante técnicas de *metabarcoding* ofrece una visión más completa y profunda de los microorganismos presentes en dientes con periodontitis apical secundaria asintomática. Desde el enfoque de las ciencias básicas, este análisis permite comprender la complejidad de las comunidades microbianas involucradas y esta información resulta fundamental para establecer correlaciones entre determinados perfiles microbianos y el comportamiento clínico de las lesiones periapicales.

No obstante, el diagnóstico en estas condiciones no puede depender exclusivamente del componente microbiológico. Las respuestas del huésped, moduladas por factores como la inmunidad local, la historia clínica, la anatomía radicular y la calidad del tratamiento endodóntico previo, también desempeñan un papel determinante en la evolución clínica de la enfermedad (116). Por tanto, es necesario considerar que el perfil microbiano por sí solo no constituye un criterio diagnóstico absoluto, sino que debe integrarse con la evaluación clínica y radiográfica del paciente. En consecuencia, este estudio refuerza la importancia de la integración entre las ciencias básicas y la práctica clínica para lograr una comprensión integral de las infecciones endodónticas persistentes (117). La aplicación del *metabarcoding* en el entorno clínico no solo amplía las herramientas diagnósticas disponibles, sino que también plantea la necesidad de considerar las particularidades biológicas de cada paciente, promoviendo un enfoque más personalizado en la toma de decisiones terapéuticas (118,119).

Una de las principales limitaciones de este estudio radica en la falta de evaluación longitudinal de la presencia o resolución de lesiones apicales antes y después del tratamiento endodóntico convencional. La ausencia de seguimiento radiográfico impide clínica de la lesión periapical. Esta limitación restringe la posibilidad de correlacionar los hallazgos microbiológicos con el éxito o fracaso del tratamiento, dificultando así la interpretación del papel de ciertos grupos bacterianos en la persistencia o resolución del proceso infeccioso (91,92).

Finalmente, con el perfeccionamiento de los enfoques metagenómicos, la investigación del microbioma tenderá a centrarse en las complejas interacciones entre las bacterias y su huésped. La integración entre el análisis de nutrientes, los genomas del huésped y otros metadatos complementarios permitirá construir

una visión más detallada e integral de estas interacciones. A medida que se produzcan alteraciones en el equilibrio normal de la microbiota, estos enfoques facilitarán una comprensión más profunda de la etiopatogenia de las enfermedades periapicales, contribuyendo así al desarrollo de estrategias diagnósticas y terapéuticas más precisas (115).

## **8. RECOMENDACIONES**

- Como limitaciones de este estudio se tiene que el tamaño de muestra es pequeño, por lo cual se recomienda realizar más estudios con un mayor tamaño de muestra para fortalecer los resultados obtenidos en esta investigación.
- Se recomienda llevar a cabo estudios longitudinales que permitan evaluar de manera más completa las condiciones clínicas y biológicas del huésped, con el fin de comprender mejor la evolución de la microbiota y su impacto en el pronóstico de las infecciones endodónticas persistentes.

## **9. CONCLUSIONES**

- La marcada variabilidad en la composición microbiana entre pacientes sugiere que las infecciones endodónticas secundarias no están asociadas a un patógeno específico, sino a una interacción compleja de múltiples microorganismos, cuya dinámica puede estar influenciada por condiciones clínicas e inmunológicas propias del huésped. Esta variabilidad también explica por qué algunos casos no responden adecuadamente al tratamiento convencional, a pesar de la ausencia de síntomas. En este contexto, la identificación de microorganismos resistentes o de difícil erradicación resalta la necesidad de actualizar los protocolos de desinfección y considerar estrategias terapéuticas más eficaces y personalizadas.
- La aplicación de tecnologías de secuenciación de tercera generación (Nanopore®) permitió una caracterización detallada y de alta resolución del microbioma presente en conductos radiculares de dientes con periodontitis apical secundaria asintomática. Esta metodología reveló una comunidad microbiana compleja, diversa y altamente variable entre individuos, lo que demuestra una significativa heterogeneidad taxonómica que no podría haberse detectado con técnicas convencionales.

## 10. REFERENCIAS

1. 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 [Internet]. Vol. 11. 2019. Available from: <http://ijm.tums.ac.ir>.
2. Murad CF, Sassone LM, Faveri M, Hirata R, Figueiredo L, Feres M. Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Endod*. 2014;40(7):899–906.
3. Siqueira JF, Rôças IN. Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures. Vol. 34, *Journal of Endodontics*. Elsevier Inc.; 2008.
4. Segura-Egea JJ, Gould K, Şen BH, Jonasson P, Cotti E, Mazzoni A, et al. Antibiotics in Endodontics: a review. Vol. 50, *International Endodontic Journal*. Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 1169–84.
5. Rôças IN, Siqueira JF, Aboim MCR, Rosado AS. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial communities associated with failed endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2004 Dec;98(6):741–9.
6. Siqueira JF, Rôças IN. Exploiting Molecular Methods to Explore Endodontic Infections: Part 1-Current Molecular Technologies for Microbiological Diagnosis. 2005.
7. Pinheiro ET, Neves VD, Reis CC, Longo PL, Mayer MPA. Evaluation of the propidium monoazide-quantitative polymerase chain reaction method for the detection of viable enterococcus faecalis. *J Endod*. 2016 Jul 1;42(7):1089–92.
8. Nanopore Technology and Its Applications in Gene Sequencing.
9. Comparison between Fluorimetry (Qubit) and nanodrop.
10. Digital Barcodes for High-Throughput Screening.
11. Dubois B, Delitte M, Lengrand S, Bragard C, Legrève A, Debode F. PRONAME: a user-friendly pipeline to process long-read nanopore metabarcoding data by generating high-quality consensus sequences. *Frontiers in Bioinformatics*. 2024;4.

12. Bergenholtz G, Spångberg L. Controversies in endodontics. Vol. 15, Critical Reviews in Oral Biology and Medicine. 2004. p. 99–114.
13. Endodontics Modern Endodontic Principles Part 8: The Future of Endodontics. 2016.
14. Moreira MS, Anuar ASNS, Tedesco TK, dos Santos M, Morimoto S. Endodontic Treatment in Single and Multiple Visits: An Overview of Systematic Reviews. Vol. 43, Journal of Endodontics. Elsevier Inc.; 2017. p. 864–70.
15. Vera J, Siqueira JF, Ricucci D, Loghin S, Fernández N, Flores B, et al. One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: A histobacteriologic study. J Endod. 2012 Aug;38(8):1040–52.
16. Siqueira Junior JF, Rôças I das N, Marceliano-Alves MF, Pérez AR, Ricucci D. Unprepared root canal surface areas: Causes, clinical implications, and therapeutic strategies. Braz Oral Res. 2018;32:1–19
17. García-Castañeda Z, Gomes-Azevedo S, Flores-Treviño J, González GM, Brasil SC, Souza TM, et al. Shaping ability of BlueShaper, TruNatomy, DC Taper and HyFlex EDM in long oval canals: An ex vivo study. Int Endod J. 2023 Sep 1;56(9):1147–54.
18. Venskutonis T, Plotino G, Juodzbaly G, Mickevičiene L. The importance of cone-beam computed tomography in the management of endodontic problems: A review of the literature. Vol. 40, Journal of Endodontics. Elsevier Inc.; 2014. p. 1895–901.
19. Patel S, Brown J, Pimentel T, Kelly RD, Abella F, Durack C. Cone beam computed tomography in Endodontics – a review of the literature. Vol. 52, International Endodontic Journal. Blackwell Publishing Ltd; 2019. p. 1138–52.
20. Peters OA, Arias A, Paqué F. A Micro-computed Tomographic Assessment of Root Canal Preparation with a Novel Instrument, TRUShape, in Mesial Roots of Mandibular Molars. J Endod. 2015 Sep 1;41(9):1545–50.
21. Siqueira JF, Rôças IN. Present status and future directions in endodontic microbiology. 2014.
22. Ardila CM, Bedoya-García JA, González-Arroyave D. Antimicrobial resistance in patients with endodontic infections: A systematic scoping review of observational studies. Vol. 49, Australian Endodontic Journal. John Wiley and Sons Inc; 2023. p. 386–95.
23. Kumari KS, Dixit S, Gaur M, Behera DU, Das P, Subudhi E, et al. Comparative oral metagenome insight into acute and chronic root canal infections. J BioX Res. 2023 Dec 1;6(4):117–23.
24. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Microbial Analysis of Canals of Root-filled Teeth with Periapical Lesions Using Polymerase Chain Reaction. J Endod. 2008 May;34(5):537–40.
25. 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 [Internet]. Vol. 11. 2019. Available from: <http://ijm.tums.ac.ir>
26. Siqueira JF, Rôças IN. Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures. Vol. 34, Journal of Endodontics. Elsevier Inc.; 2008.
27. Segura-Egea JJ, Gould K, Şen BH, Jonasson P, Cotti E, Mazzoni A, et al. Antibiotics in Endodontics: a review. Vol. 50, International Endodontic Journal. Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 1169–84.
28. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. Enterococcus faecalis: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. Vol. 32, Journal of Endodontics. 2006. p. 93–8.
29. Summary. 1997.
30. Murad CF, Sassone LM, Faveri M, Hirata R, Figueiredo L, Feres M. Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. J Endod. 2014;40(7):899–906.
31. Rôças IN, Siqueira JF, Aboim MCR, Rosado AS. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial communities associated with failed endodontic treatment. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology. 2004 Dec;98(6):741–9.
32. Siqueira JF, Rôças IN. Exploiting Molecular Methods to Explore Endodontic Infections: Part 1-Current Molecular Technologies for Microbiological Diagnosis. 2005.
33. Pinheiro ET, Neves VD, Reis CC, Longo PL, Mayer MPA. Evaluation of the propidiummonoazide-quantitative polymerase chain reaction method for the detection of viable enterococcus faecalis. J Endod. 2016 Jul 1;42(7):1089–92.
34. Prado LC, Gavini G, Silveira ADC, Nakamura VC, Mayer MPA, Pinheiro ET. Comparison of rRNA-based reverse transcription PCR and rDNA-based PCR for the detection of streptococci in root canal infections. Journal of Applied Oral Science. 2019;27.
35. Yu G, Phillips S, Gail MH, Goedert JJ, Humphrys M, Ravel J, et al. Evaluation of Buccal cell samples for studies

- of oral microbiota. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2017 Feb 1;26(2):249–53.
36. Swimberghe RCD, Coenye T, De Moor RJG, Meire MA. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. Vol. 52, *International Endodontic Journal*. Blackwell Publishing Ltd; 2019. p. 604–28.
  37. Siqueira JF, Rôças IN, Riche FNSJ, Provenzano JC. Clinical outcome of the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis using an antimicrobial protocol. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2008 Nov;106(5):757–62.
  38. Godoi-Jr EP, Bronzato JD, Francisco PA, Bicego-Pereira EC, Lopes EM, Passini MRZ, et al. Microbiological profile of root canals indicated for endodontic retreatment due to secondary endodontic infections or for prosthetic reasons. *Clin Oral Investig*. 2023 May 1;27(5):2049–64.
  39. Solano C, Echeverz M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing. Vol. 18, *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd; 2014. p. 96–104.
  40. 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.
  41. Rôças IN, Siqueira JF. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. *J Clin Microbiol*. 2012;50(5):1721–4.
  42. Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, Louzada LM, Lima AR, Marciano MA, Almeida JFA, et al. Microbiological investigation in teeth with persistent/secondary endodontic infection in different stages of root canal retreatment. *Eur Endod J*. 2020;5(3):219–25.
  43. Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, Louzada LM, Lima AR, Marciano MA, Almeida JFA, et al. Microbiological investigation in teeth with persistent/secondary endodontic infection in different stages of root canal retreatment. *Eur Endod J*. 2020;5(3):219–25.
  44. Rôças IN, Siqueira JF. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. *J Clin Microbiol*. 2012;50(5):1721–4.
  45. Present status and future directions Microbiology of endodontic infections.
  46. Biofilms and apical periodontitis study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings.
  47. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions.
  48. 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.
  49. Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions.
  50. 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.
  51. 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 Dec 1;48:12–8.
  52. Schirrmeister 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 Feb;35(2):169–74.
  53. 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).
  54. Rôças IN, Siqueira JF. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. *J Clin Microbiol*. 2012;50(5):1721–4.
  55. Mueller RL. Genome biology and the evolution of cell-size diversity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Nov 1;7(11).
  56. Kysela DT, Randich AM, Caccamo PD, Brun Y V. Diversity Takes Shape: Understanding the Mechanistic and Adaptive Basis of Bacterial Morphology. *PLoS Biol*. 2016 Oct 3;14(10).
  57. David Goldman A, Landweber LF. What Is a Genome? 2016; Available from: <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/hgp/genome>.
  58. pearson2008.
  59. Claverie JM, Abergel C. Mimivirus and its virophage. Vol. 43, *Annual Review of Genetics*. 2009. p. 49–66.
  60. Flores E, Herrero A. Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria.

- Vol. 8, *Nature Reviews Microbiology*. 2010. p. 39–50.
61. Rosenberg SM. Life, Death, Differentiation, and the multicellularity of bacteria. Vol. 5, *PLoS Genetics*. 2009.
  62. Worning P, Jensen LJ, Hallin PF, Staerfeldt HH, Ussery DW. Origin of replication in circular prokaryotic chromosomes. *Environ Microbiol* [Internet]. 2006;8(2):353–61. Available from: <http://www.cbs.dtu.dk/services/GenomeAtlas/suppl/origin>
  63. Nandakumar J, Cech TR. Finding the end: Recruitment of telomerase to telomeres. Vol. 14, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013. p. 69–82.
  64. Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K, Brown CT, Probst AJ, Castelle CJ, et al. A new view of the tree of life. *Nat Microbiol*. 2016 Apr 11;1(5).
  65. Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms (archaebacteria/eubacteria/urkaryote/16S ribosomal RNA/molecular phylogeny). Vol. 74. 1977.
  66. Williams TA, Foster PG, Cox CJ, Embley TM. An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life. Vol. 504, *Nature*. 2013. p. 231–6.
  67. Dunham I, Kundaje A, Aldred SF, Collins PJ, Davis CA, Doyle F, et al. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012 Sep 6;489(7414):57–74.
  68. Rands CM, Meader S, Ponting CP, Lunter G. 8.2% of the Human Genome Is Constrained: Variation in Rates of Turnover across Functional Element Classes in the Human Lineage. *PLoS Genet*. 2014;10(7).
  69. Atkinson TJ, Halfon MS. Regulation of gene expression in the genomic context. Vol. 9, *Computational and Structural Biotechnology Journal*. Elsevier B.V.; 2014. p. e201401001.
  70. Narlikar L, Ovcharenko I. Identifying regulatory elements in eukaryotic genomes. Vol. 8, *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*. 2009. p. 215–30.
  71. Moussa DG, Ahmad P, Mansour TA, Siqueira WL. Current State and Challenges of the Global Outcomes of Dental Caries Research in the Meta-Omics Era. Vol. 12, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
  72. Paster BJ, Dewhirst FE. Molecular microbial diagnosis. *Periodontol* 2000. 2009 Oct;51(1):38–44.
  73. Leser TD, Amenuvor JZ, Jensen TK, Lindecrona RH, Boye M, Møller K. Culture-independent analysis of gut bacteria: The pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(2):673–90.
  74. Aguiar-Pulido V, Huang W, Suarez-Ulloa V, Cickovski T, Mathee K, Narasimhan G. Metagenomics, metatranscriptomics, and metabolomics approaches for microbiome analysis. Vol. 12, *Evolutionary Bioinformatics*. Libertas Academica Ltd.; 2016. p. 5–16.
  75. Duran-Pinedo AE, Frias-Lopez J. Beyond microbial community composition: Functional activities of the oral microbiome in health and disease. *Microbes Infect*. 2015 Jul 1;17(7):505–16.
  76. Nanopore Technology and Its Applications in Gene Sequencing.
  77. Comparison between Fluorimetry (Qubit) and nanodrop.
  78. Applications of electrophoresis for small enantiomeric.
  79. Digital Barcodes for High-Throughput Screening.
  80. Dubois B, Delitte M, Lengrand S, Bragard C, Legrève A, Debode F. PRONAME: a user-friendly pipeline to process long-read nanopore metabarcoding data by generating high-quality consensus sequences. *Frontiers in Bioinformatics*. 2024;4.
  81. Preparation of samples used for evaluation [Internet]. Available from: [www.nature.com/scientificreports/](http://www.nature.com/scientificreports/)
  82. Comparison of Methods for Picking the Operational Taxonomic Units From Amplicon Sequences.
  83. Unifying Species Diversity hill numbers.
  84. Buonavoglia A, Zamparini F, Lanave G, Pellegrini F, Diakoudi G, Spinelli A, et al. Endodontic Microbial Communities in Apical Periodontitis. *J Endod*. 2023 Feb 1;49(2):178–89.
  85. Microbial Community Composition and Diversity via 16S rRNA Gene Amplicons illumina.
  86. Long fragments achieve base quality in Illumina paired-end sequencing.
  87. Gamaarachchi H, Ferguson JM, Samarakoon H, Liyanage K, Deveson IW. Simulation of nanopore sequencing signal data with tunable parameters. *Genome Res*. 2024 May 1;34(5):778–83.
  88. Wang Y, Zhao Y, Bollas A, Wang Y, Au KF. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. Vol. 39, *Nature Biotechnology*. Nature Research; 2021. p. 1348–65.
  89. MiSeq™.

90. From squiggle to basepair computational approaches for improving nanopore sequencing read accuracy.
91. 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.
92. Pérez-Carrasco V, Uroz-Torres D, Soriano M, Solana C, Ruiz-Linares M, Garcia-Salcedo JA, et al. Microbiome in paired root apices and periapical lesions and its association with clinical signs in persistent apical periodontitis using next-generation sequencing. *Int Endod J.* 2023 May 1;56(5):622–36.
93. Sánchez-Sanhueza G, Bello-Toledo H, González-Rocha G, Gonçalves AT, Valenzuela V, Gallardo-Escárate C. Metagenomic study of bacterial microbiota in persistent endodontic infections using Next-generation sequencing. *Int Endod J.* 2018 Dec 1;51(12):1336–48.
94. Bouillaguet S, Manoel D, Girard M, Louis J, Gaia N, Leo S, et al. Root microbiota in primary and secondary apical periodontitis. *Front Microbiol.* 2018 Oct 9;9(OCT).
95. 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 Dec 1;48:12–8.
96. Chávez De Paz L, Svensäter G, Dahlén G, Bergenholtz G. Streptococci from root canals in teeth with apical periodontitis receiving endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology.* 2005 Aug;100(2):232–41.
97. Gomes BPFA, Bronzato JD, Almeida-Gomes RF, Pinheiro ET, Sousa ELR, Jacinto RC. Identification of *Fusobacterium nucleatum* in primary and secondary endodontic infections and its association with clinical features by using two different methods. *Clin Oral Investig.* 2021 Nov 1;25(11):6249–58.
98. Schirrmeister 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 Feb;35(2):169–74.
99. Santos VR dos, Valdez RMA, Danelon M, Souza JAS, Caiaffa KS, Delbem ACB, et al. Effect of *S. mutans* combinations with bifidobacteria/lactobacilli on biofilm and enamel demineralization. *Braz Oral Res.* 2021;35:e030.
100. Jhajharia K, Parolia A, Shetty KV, Mehta LK. Biofilm in endodontics: a review. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2015;5(1):1–12.
101. Barbosa-Ribeiro M, Gomes BPFA, Arruda-Vasconcelos R, de Albuquerque Monteiro I, Costa MJF, Sette-de-Souza PH. Antibiotic resistance profile of clinical strains of Enterococci from secondary/persistent endodontic infections: What do we know? A systematic review of clinical studies. *J Endod.* 2024;50(3):299–309.
102. Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Gomes BPFA. Antimicrobial susceptibility and characterization of virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolates from teeth with failure of the endodontic treatment. *J Endod.* 2016;42(7):1022–8.
103. Siqueira Jr JF, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res.* 2009;88(11):969–81.
104. Downes J, Vartoukian SR, Dewhirst FE, Izard J, Chen T, Yu WH, et al. *Pyramidobacter piscicola* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum ‘Synergistetes’ isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009;59(5):972–80.
105. Sedgley C, Buck G, Appelbe O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod.* 2006;32(2):104–9.
106. Rôças IN, Neves MAS, Provenzano JC, Siqueira Jr JF. Susceptibility of as-yet-uncultivated and difficult-to-culture bacteria to chemomechanical procedures. *J Endod.* 2014;40(1):33–7.
107. Siqueira JF. *Pseudoramibacter alactolyticus* in Primary Endodontic Infections [Internet]. 2003. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
108. Nobrega LMM, Montagner F, Ribeiro AC, Mayer MAP, de Almeida Gomes BPF. Bacterial Diversity Of Symptomatic Primary Endodontic Infection By Clonal Analysis. *Braz Oral Res.* 2016;30(1):1–9.
109. B. Abraham S, Al-Marzooq F, Samaranayake L, Hamoudi RA, Himratul-Aznita WH, Aly Ahmed HM. Molecular analyses indicate profuse bacterial diversity in primary and post-treatment endodontic infections within a cohort from the United Arab Emirates-A preliminary study. *PLoS One.* 2024;19(7):e0305537.
110. Molecular analyses indicate profuse bacterial.
111. Al-Ahmad A, Ameen H, Pelz K, Karygianni L, Wittmer A, Anderson AC, et al. Antibiotic resistance and capacity for biofilm formation of different bacteria isolated from endodontic infections associated with root-filled teeth. *J*

Endod. 2014;40(2):223–30.

112. 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 Aug 1;42(8):1239–45.

113. Chetty A, Blekhman R. Multi-omic approaches for host-microbiome data integration. Vol. 16, *Gut Microbes*. Taylor and Francis Ltd.; 2024.

114. 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 Aug 1;42(8):1239–45.

115. Chetty A, Blekhman R. Multi-omic approaches for host-microbiome data integration. Vol. 16, *Gut Microbes*. Taylor and Francis Ltd.; 2024.

116. Santangelo, G. V., López, M. A., & Tudor, C. I. (2022). Diagnóstico y semiología en endodoncia. Libros de Cátedra.

117. Schuweiler, D., Ordinola-Zapata, R., Dietz, M., Lima, B. P., Noblett, W. C., & Staley, C. (2024). Microbial diversity in primary endodontic infections: demographics and radiographic characteristics. *Clinical oral investigations*, 28(11), 591.

118. Sánchez-Sanhueza, G., Bello-Toledo, H., González-Rocha, G., Gonçalves, A. T., Valenzuela, V., & Gallardo-Escárate, C. (2018). Metagenomic study of bacterial microbiota in persistent endodontic infections using next-generation sequencing. *International endodontic journal*, 51(12), 1336-1348.

119. Kumari, K. S., Dixit, S., Gaur, M., Behera, D. U., Dey, S., Sahoo, R. K., ... & Subudhi, E. (2023). Taxonomic assignment-based genome reconstruction from apical periodontal metagenomes to identify antibiotic resistance and virulence factors. *Life*, 13(1), 194.