



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA**



**Centro de Investigación en Ciencias de la
Salud y Biomedicina (CICSaB)**



**ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA ORAL DE DIENTES
PRIMARIOS INFECTADOS POR MEDIO DE
PIROSECUENCIACIÓN**

TESIS QUE PRESENTA

M. C. ENID KARINA SALAS LÓPEZ

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS**

**CODIRECTORES DE TESIS
DRA: ESTHER LAYSECA ESPINOSA
DR. AMAURY DE JESÚS POZOS GUILLEN**

Enero 2020

CREDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Ciencias Básicas de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luís Potosí, bajo la tutoría del Dr. Amaury de Jesús Pozos Guillén y en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica (IPICYT), bajo la tutoría del Dr. J. Sergio Casas Flores, gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología que otorgó la beca con número 201897. Para la realización de este trabajo se utilizaron los recursos propios del Laboratorio de Ciencias Biomédicas Básicas de la Facultad de Estomatología de la U.A.S.L.P. y del Laboratorio de Biología Molecular del IPICYT.

Tesis que presenta:

M. C. ENID KARINA SALAS LÓPEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS

CODIRECTORES DE TESIS

Dra. Esther Layseca Espinosa

Dr. Amaury de Jesús Pozos Guillén

ASESORES INTERNOS

Dra. Perla del Carmen Niño Moreno

Dr. Christian Alberto García Sepúlveda

ASESOR EXTERNO

Dr. Sergio Casas Flores

JURADO

Dr. Amaury de Jesús Pozos Guillén

Dra. Esther Layseca Espinosa

Dra. Perla del Carmen Niño Moreno

Dr. J. Sergio Casas Flores.

Dra. Mariana Salgado Bustamante

Enero 2020

RV: Med Oral Patol Oral Cir Bucal, Ref. 23689, 2020-01-22

23689.pdf
5 MB

De: medoral.es [mailto:medoral@medoral.es]

Enviado el: miércoles, 22 de enero de 2020 02:46 p. m.

Para: AMAURY DE JESUS POZOS GUILLEN

Asunto: Med Oral Patol Oral Cir Bucal, Ref. 23689, 2020-01-22

2020-01-22

Reference: 23689

Dear Dr. Amaury Pozos,

Your manuscript entitled "Pyrosequencing analysis of the microbiota of primary infected teeth" has been successfully submitted online and has been forwarded to the referees for evaluation. In due time, you will be informed as to its possible publication in Med Oral Patol Oral Cir Bucal.

For any comment or problems do not reply to this email. Send an email to: articles_medoral@medoral.es

Yours sincerely.

ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA ORAL DE DIENTES PRIMARIOS INFECTADOS POR MEDIO DE PIROSECUENCIACIÓN

Introducción:

La relación de los microorganismos con las patologías pulpares fue establecida en 1894, cuando Miller propuso la hipótesis de que las bacterias son los agentes causales de las enfermedades de origen endodóntico, debido a que observaba una prevalencia de bacterias en conductos radiculares asociados con condiciones patológicas.¹

Los microorganismos de la cavidad bucal se han referido como la microflora oral, microbiota oral y más recientemente como el microbioma oral, que fue acuñado por Joshua Lederberg y significa una comunidad de microorganismos comensales, simbióticos y patógenos, que comparten nuestro espacio corporal pero se ignora como pueden ser determinantes en la salud y en la enfermedad.²⁻³

La importancia de los microorganismos en el desarrollo de signos y síntomas presentes en las afecciones pulpares, es diversa y poco conocida.⁴ Muchos autores han señalado que la presencia individual de un microorganismo específico puede llegar a determinar la existencia de signos y síntomas.^{5,6} Sin embargo, otros defienden que la asociación de varios microorganismos, a través de la creación de complejos microbianos, pueden ser los responsables del desarrollo de signos y síntomas presentes en las enfermedades pulpares, y dependiendo del microorganismo presente serán los signos y síntomas, así como la gravedad de la patología pulpar o perirradicular.⁷

En los conductos radiculares existen diferentes tipos de infecciones, y se asocian a diferentes condiciones clínicas, causando lesiones perirradiculares agudas o crónicas. La

composición de la microbiota varía en relación a la infección y al tipo de lesión perirradicular, en general, son infecciones mixtas con predominio de bacterias anaerobias y anaerobias facultativas.⁸

El complejo bacteriano, formado por *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola* llamado *red complex* se cree que puede ser causante de formas graves de enfermedad periodontal y síntomas de origen endodóntico.⁹

Las bacterias juegan un rol importante para la instalación de infecciones pulpares, y el objetivo de su tratamiento es la eliminación de las mismas del canal radicular, sin embargo, en dientes temporales hay muy pocos estudios que identifiquen el tipo de microorganismos que están presentes y tomando en cuenta que los microorganismos anaerobios representan el 70% de los microorganismos que habitan en un canal radicular infectado es necesario identificarlos por medio de métodos moleculares, ya que se ha estimado que tan solo menos de la mitad de las especies bacterianas de la cavidad oral pueden ser cultivadas por métodos microbiológicos de anaerobiosis tradicionales.^{2, 3, 10}

En estudios en dientes temporales se han identificado bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Stafilococcus*, *Fusobacterias*, *Pseudomonas*, *Prevotella* y *Veionella* por métodos de cultivo tradicionales y en algunos estudios con hibridización de DNA se identificaron: *Prevotella Intermedia*, *Neisseria mucosa*, *Prevotella Nigrescens* y *Tannerella forsythia*, sin embargo, el propósito de esos estudios fue identificar microorganismos esenciales de infecciones endodónticas y la base de datos fue limitada.^{11,12,13}

Con respecto a los dientes permanentes, se han reportado más trabajos basados en métodos moleculares y se han reportado filos como: *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Prfoteobacteria*, *Prevotella*, *Actinomices* y *Espiroquetas*. En estudios donde se utilizó el método de pirosecuenciación en dientes permanentes se encontraron principalmente filos de *Bacteroidetes* y especies de *Prevotella*, *Propionobacterium*, *Phyramidobacter*, *Fusobacterium* y *Phorphyromonas*^{14,15,16} Rocas y col. Encuentran que de las 6 OTUS mas abundantes 4 pertenecen al género de *Lactobacillus* y otras dos al género *Olsenella* y *Pseudoramibacter*.¹⁷

Por lo que proponemos realizar una identificación de microorganismos en infecciones pulpares de dientes temporales ya que no existe mucha información al respecto, el conocer dichos microorganismos nos ayudara a modificar el tratamiento utilizado actualmente para erradicar las infecciones pulpares y la antibioticoterapia empleada, el tratamiento de pulpectomia en dientes temporales es un tratamiento de rutina y el propósito del estudio es identificar los microorganismos en dientes temporales con infección por métodos moleculares, con la finalidad de mejorar la terapeutica hasta ahora utilizada y evitar posibles fracasos del tratamiento.

Materiales y métodos:

El protocolo de investigación fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Se incluyeron 13 molares temporales inferiores correspondientes a 13 pacientes con edades entre 4 y 7 años de edad que acudieron al posgrado de Estomatología Pediátrica de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Los padres firmaron un consentimiento informado y se les tomó una radiografía control para verificar que la raíz tuviera 2/3 partes de su formación. Los pacientes que tomaron antibiótico 1 mes antes del procedimiento, o que padecieran alguna enfermedad sistémica fueron descartados (tabla 1).

Los molares fueron aislados con dique de hule y se desinfectó el campo operatorio con peróxido de hidrógeno al 30% por un minuto, hipoclorito de sodio al 5.25% por un minuto y tiosulfato de sodio al 10% por otro minuto y se realizó la desinfección por triplicado. Se abrió la cámara pulpar con fresa estéril y se lavó con suero estéril, se colocó un sello de provisit. Posteriormente, se realizó nuevamente la desinfección por triplicado. Se tomaron dos muestras control del campo operatorio con un hisopo estéril, una se colocó en agar sangre de carnero y se incubó a 37° C por 24 horas y la otra se colocó en 400 µL de buffer de extracción de DNA total (ver más abajo) para incluirlo como control negativo. La muestra se recolectó con una micropipeta estéril haciendo dos lavados de 200 µl con suero estéril y se colocó en 400 µl de buffer de extracción de DNA total para almacenarlos a -20 °C.

Pirosecuenciación:

La pirosecuenciación o también llamada secuenciación 454, determina la secuencia de ADN a gran escala por medio de luminiscencia. Permite secuenciar grandes cantidades de ADN a un costo menor. Fue desarrollado por Rognaghi y Nygren en 1996 y adquirida por Roche en 2007.

Extracción de DNA total. A la muestra obtenida se le añadieron 200µg de perlas de vidrio, posteriormente 15µL de lizosima 20/mL y se mezcló por agitación en un vortex, se incubó por 2 horas a 37° C y se le agregaron 5µL de proteinasa K y 50µL de SDS al 20%. Se incubó nuevamente por 2 horas a 65°C y se mezcló cada 30 minutos. Se añadió un volumen de cloroformo y se centrifugó a 13,000rpm por 10 minutos, se recuperó la fase acuosa y se le añadió 1 volumen de isopropanol al 70% para incubarse a -20°C durante toda la noche. Se centrifugó a 13000 rpm por 20 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó con 750µL de etanol al 70%, se centrifugó nuevamente pero ahora por 5 minutos, se eliminó el etanol y se dejó secar. Por último, se resuspendió la pastilla de DNA en 20 µL de agua inyectable estéril. La pirosecuenciación del trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Genómicas para la Biodiversidad (LANGEBIO).

Reacción en cadena de la polimerasa. Cada reacción de PCR se realizó 0.3µL de los oligonucleótidos universales para 16S rDNA, 533F y 1391R con una concentración inicial de 10µM (tabla 1), cada PCR se cargó con 0.3µL de cada oligonucleótido, 2.5µL de MgCl₂ a una concentración inicial de 25mM, 0.125 U de Go Taq de Promega, 14.4µL de Agua bidestilada estéril, 0.4µL de dNTPs a una concentración inicial de 10mM. Se utilizó un termociclador (Applied Biosystems). El programa de PCR fue el siguiente: Inicialmente se llevó a una temperatura de desnaturalización a 95° C por 5 min, 40 ciclos con una temperatura de desnaturalización a 95° C por 30 segundos, alineación a 60° C por 30 segundos, elongación

1	F	6	85	Si	Amalgama	Si	Si
2	F	6	85	Si	Cerrada	No	No
3	F	5	84	Si	Cerrada	Si	Si
4	F	7	84	Si	Cerrada	Si	No
5	M	7	75	Si	Cavidad	Si	Si
6	M	4	75	Si	Cavidad	No	No
7	M	4	75	Si	Cavidad	No	No
8	M	7	74	Si	Cerrada	Si	Si
9	M	7	85	Si	Cerrada	No	Si
10	M	5	84	Si	Cavidad	No	Si
11	M	7	85	Si	Amalgama	Si	Si
12	F	4	85	Si	Cerrada	No	Si
13	F	4	74	Si	cerrada	Si	Si

Tabla 1: en ésta tabla se muestran el total de muestras y las características clínicas que tenía el paciente cuando llegó.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizado.

Primer	Secuencia(5´-3´)	Referencia
533F	GTGCCAGCAGCCGCGGTAA	Weisburg et al. 1991
1491R	GACGGGCGGTGTGRCA	Turner et al. 1999
F1_16S_U515F	ccatctcatccctgcgtgtctccgactcagacgagtgcgtgtgccagcmgccgcgtaa	

F2_16S_U515F	ccatctcatccctgcgtgtctccgactcagacgctcgcagtgccagcmgccgcggtaa	
F3_16S_U515F	ccatctcatccctgcgtgtctccgactcagagacgcactcgtgccagcmgccgcggtaa	
F4_16S_U515F	ccatctcatccctgcgtgtctccgactcagagcactgtaggtgccagcmgccgcggtaa	
F5_16S_U515F	ccatctcatccctgcgtgtctccgactcagatcagacacggtgccagcmgccgcggtaa	
F6_16S_U515F	ccatctcatccctgcgtgtctccgactcagatcgcgaggtgccagcmgccgcggtaa	
F7_16S_U515F	ccatctcatccctgcgtgtctccgactcagcgtgtctctagtccagcmgccgcggtaa	
F8_16S_U515F	ccatctcatccctgcgtgtctccgactcagctcgcgtgtcgtgccagcmgccgcggtaa	
F9_16S_U515F	ccatctcatccctgcgtgtctccgactcagtagtaccagcgtgccagcmgccgcggtaa	
F10_16S_U515F	ccatctcatccctgcgtgtctccgactcagtctctatgcggtgccagcmgccgcggtaa	
F11_16S_U515F	ccatctcatccctgcgtgtctccgactcagtgatacgtctgtgccagcmgccgcggtaa	
F12_16S_U515F	ccatctcatccctgcgtgtctccgactcagtagtactgagctagtgccagcmgccgcggtaa	
F13_16S_U515F	ccatctcatccctgcgtgtctccgactcagcatagtagtggtgccagcmgccgcggtaa	
F14_16S_U515F	ccatctcatccctgcgtgtctccgactcagcgcgagatacgtgccagcmgccgcggtaa	
R1_16S_E1406R	cctatcccctgtgtgccttggcagctcaggacgggcggtgwgtrca	

TABLA 2. Los oligonucleótidos firma se componen de una secuencia específica, seguida de de la secuencia firma variable en cada oligonucleótido y terminando con la secuencia del oligonucleótido universal.

Análisis de la diversidad microbiológica.

Se convirtieron los datos a formato FASTA y FASTQ para su procesamiento.

RESULTADOS:

Se llevó a cabo la pirosecuenciación de 13 muestras de dientes temporales inferiores con infección pulpar, los datos fueron preprocesados y separados según su código de barras usado en cada muestra, posteriormente se compararon con la base de datos de rDNA 16Smicrobial del NCBI.

En total se tenían 8 carriles con las 13 muestras para un total de 27,467 secuencias con una longitud promedio de 992 bases (mínimo=110, máximo =1,774) y se asignaron correctamente a su código de barras las 27,467 es decir el 100% de las secuencias.

El 94.2% de las secuencias fueron asignadas a una muestra, 24,394 (88.8%) de las secuencias fueron asignadas a un taxa.

Se detectaron en total 486 especies y 235 géneros aproximadamente, en algunos casos no se pudo determinar con precisión la especie. En la tabla 3 observamos el número de secuencias por muestra, así como las que tuvieron hit y las que no.

Tabla 3: Secuencias por muestra.

MUESTRA	TOTAL	CON HIT (%)	SIN HIT (%_)
1	1217	1164 (95.6%)	53 (4.4%)
2	1543	1498 (97.1%)	45 (2.9%)
3	2709	2701 (99.7%)	8 (0.3%)
4	1271	1239 (97.5%)	32 (2.5%)
5	2491	2485 (99.8%)	6 (0.2%)
6	1685	1682 (99.8%)	3 (0.2%)
7	2409	2404 (99.8%)	5 (0.2%)
8	1258	298 (23.7%)	960 (76.3%)
9	2397	2047 (85.4%)	350 (14.6%)
10	2867	2805 (97.8%)	62 (2.2%)
11	2445	2705 (84.9%)	370 (15.1%)
12	1550	817 (52.7%)	733 (47.3%)
13	3624	3178 (87.7%)	446 (12.3%)

Tabla 3: se observa el total de muestras y las secuencias que se obtuvieron de cada muestra, así como las que se amplificaron y las que no.

Población bacteriana.

Se identificaron 9 phyllos en las 13 muestras utilizando el software Mothur (fig. 1). Los más abundantes fueron los bacteroidetes con 35.15%, seguidos de los firmicutes con 33.30% y las fusobacterias con 10.05%. En menor cantidad se encontraron las actinobacterias con un 13.55%, proteobacterias con 6.28%, espiroquetas con 0.30%, sinergistas con 0.05% y por último las cianobacterias con tan solo 0.025%, y bacterias no clasificadas con un 1.20%. En el nivel de género se encontraron 235, de los cuales los más abundantes fueron *Prevotella*, *Lactobacillus*, y *Veionella*. (fig 2). En el nivel de especie se encontraron 486 especies las más abundantes fueron *Prevotella oris*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella multisaccharivorax*, *Veionella* y *estreptococos* (fig. 3)

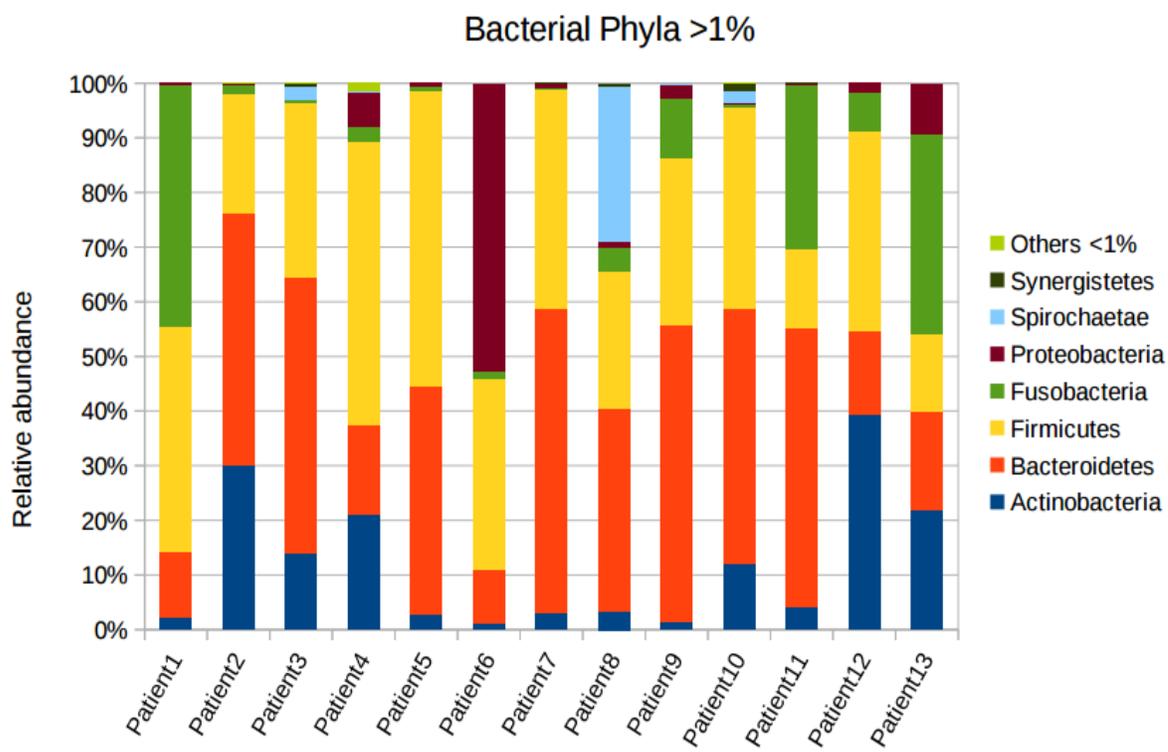


Figura 1. Filos encontrados. Se muestran los diferentes filos encontrados en cada una de las muestras, ejemplificada de manera vertical y del lado izquierdo observamos el porcentaje que abarca cada microorganismo.

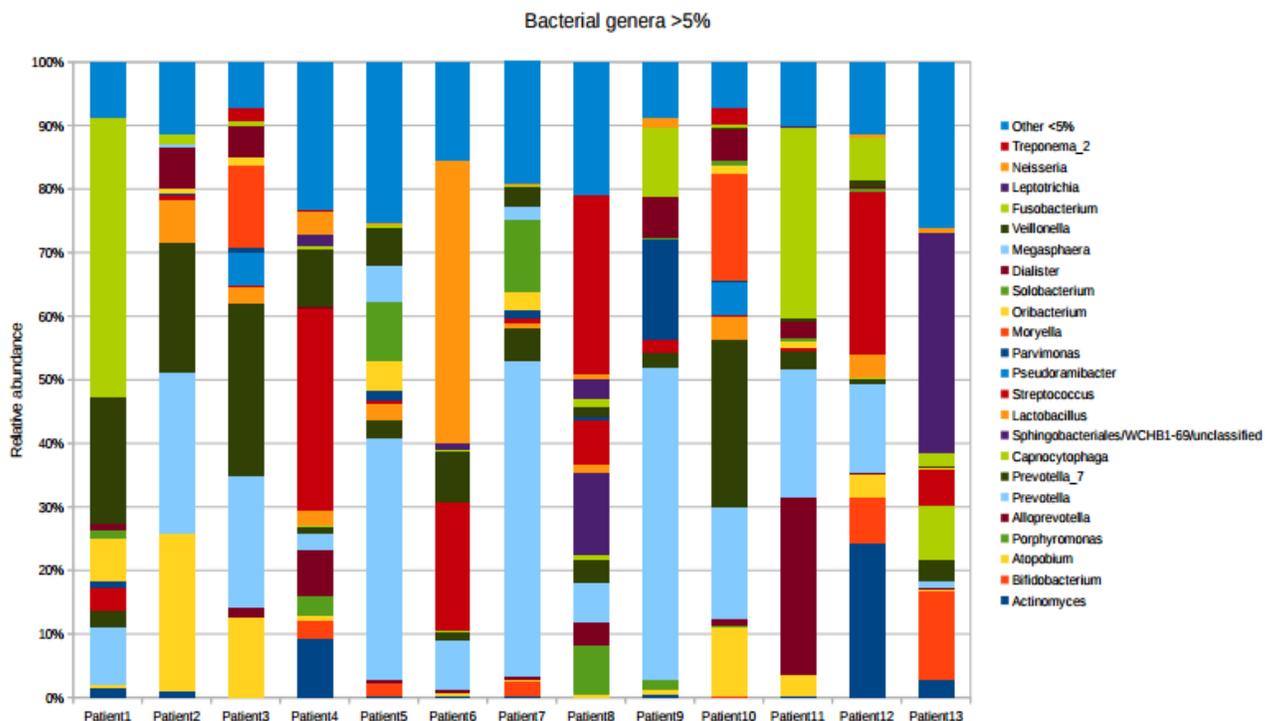


Figura 2. Se muestran los géneros que se encontraron con mayor abundancia en cada muestra especificado como número de paciente, y del lado derecho observamos por medio del color a que microorganismo pertenece, así como su porcentaje, donde observamos que el más abundante es el género de *prevotella*.

Comparando las muestras entre sí para verificar comunidades similares se realizó un dendrograma. Se encontraron muestras muy similares entre sí como la número 1 y la 3 o la 5

y la 7, la muestra menos compatible con el resto fue la número 8 , sin embargo todas las muestras muestran cierta similitud en cuanto a comunidades bacterianas y no hubo diferencias significativas entre todas las muestras (fig. 4)

Se tomaron los primeros 50 géneros y se realizó una gráfica donde se observan los que están presentes en la totalidad de las muestras, y se muestran por orden descendente los que se encuentran en mayor cantidad donde siguen predominando la *Prevotella*, *Vaionella* y *Fusobacterium*, que se encuentran en la totalidad de las muestras y en mayor cantidad (fig. 5)

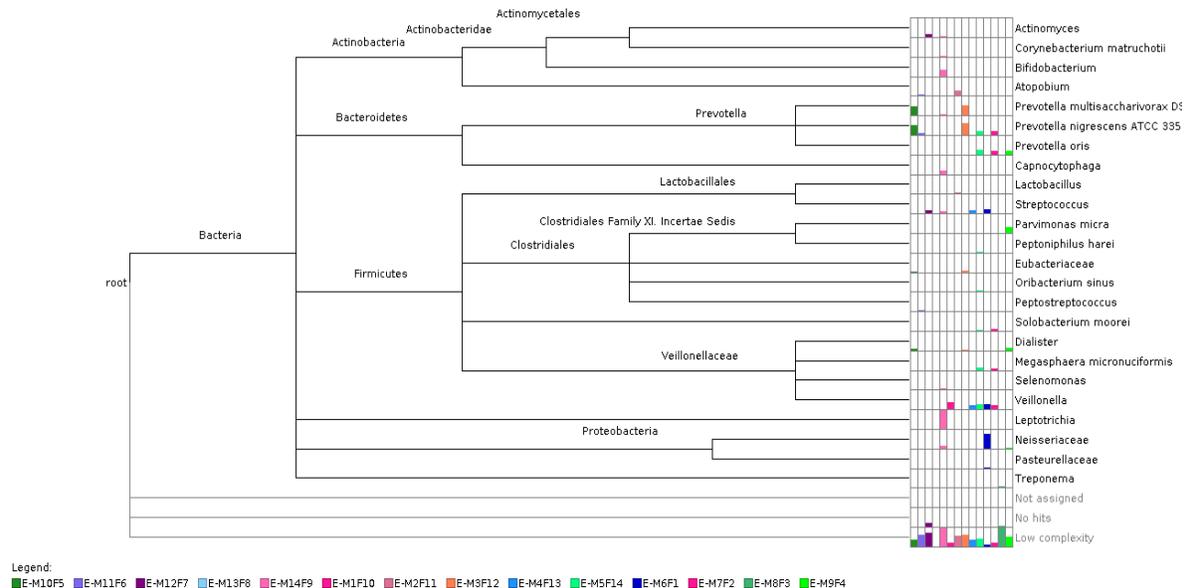


FIGURA 3. PRINCIPALES GÉNEROS Y ESPECIES ENCONTRADOS. Podemos observar un árbol filogenético, con la finalidad de observar los géneros y especies mas representativas por muestra, pasando por el phylo, clase y familia, de las mismas. De manera horizontal se observa el phylo, clase, familia, género y especie. Siendo los mas abundantes en cuanto a género la *prevotella*, *lactobacilos*, *veionella* y *proteobacterias*. Y de especies la *prevotella nigrescens*, *prevotella multisaccharivorax*, *prevotella oris*, *estrepctococos* y *veionella*. Y de manera vertical en la parte de abajo observamos por muestra la abundancia

de las especies, donde cada muestra está representada por un color diferente y su asociación con la especie anotada del lado derecho.

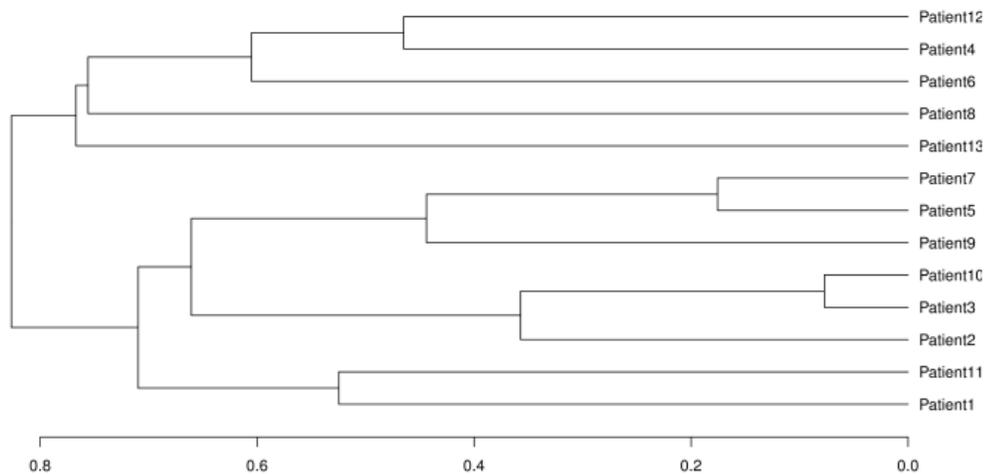


Figura 3. Dendrograma de similitudes. donde se observa la similitud entre muestras, con la finalidad de verificar cuantas muestras son distintas entre si y cuales comparten características bacterianas similares. De el lado derecho vemos las diferentes muestras con colores diferentes cada una y su relación con las demás, entre mas cercana se encuentre la llave son más parecidas entre si, como es el caso de la muestra número uno y la número tres que poseen características bacterianas muy semejantes. En general no se encontraron diferencias significativas entre las muestras.

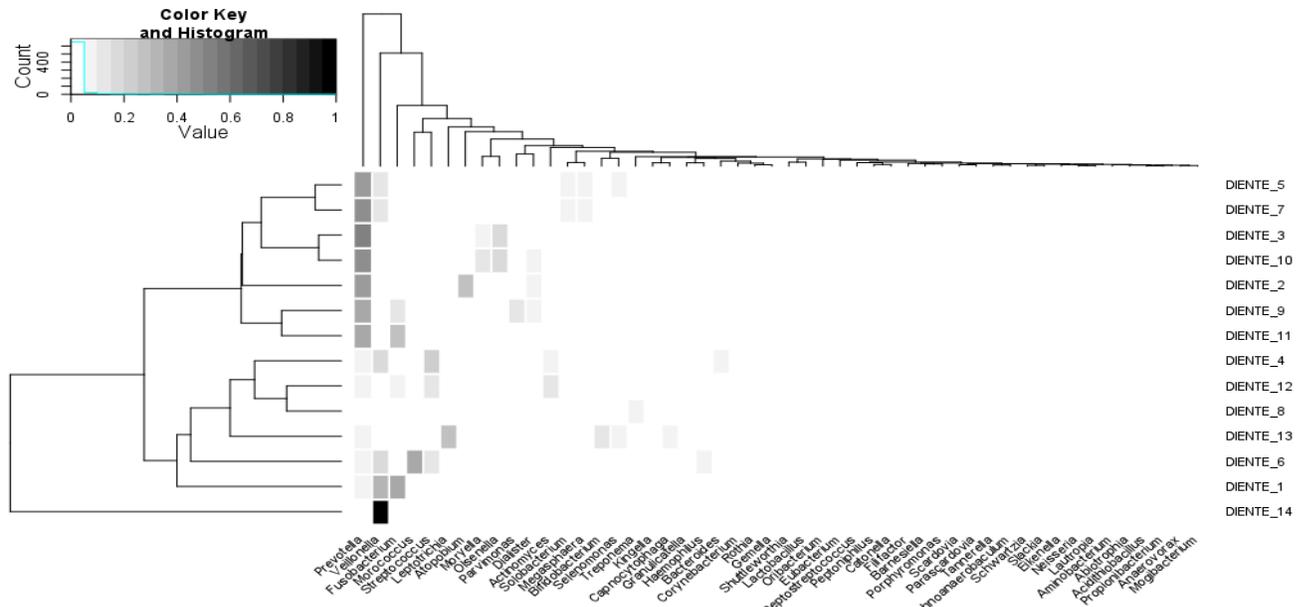


figura 4. principales 50 géneros encontrados en la totalidad de muestras. Se tomaron los primeros 50 géneros mas abundantes que se encontraron con la finalidad de obtener los microorganismos que se encuentran en todas las muestras y su cantidad por muestra, en la parte de abajo encontramos los principales 50 géneros encontrados y su relación con cada muestra graficada del lado derecho, entre mas oscuro se encuentre marcado mayor cantidad de microorganismo existe. Podemos observar que la *prevotella*, *veionella fusobacteria*, *morococos* y *streptococos*, son los mas abundantes en cuanto a cantidad y son los que se encuentran en casi todas las muestras.

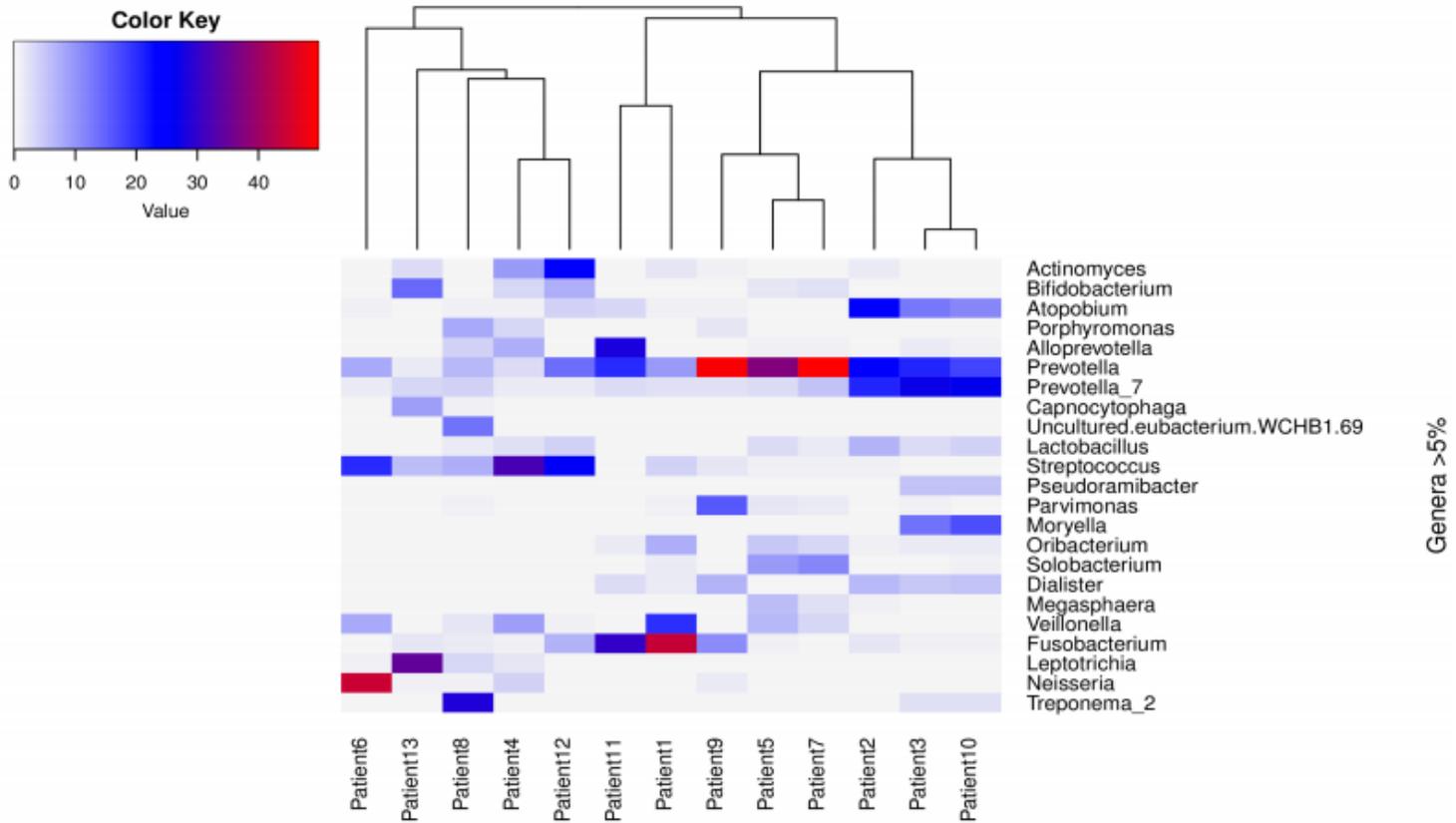


Figura 6. Mapa donde se pueden observar similitudes entre muestras y microorganismos, del lado derecho observamos el microorganismo, en la parte inferior a que muestra corresponde y en la parte superior las llaves de similitudes, entre mas oscuro sea el color hay una mayor cantidad de dicho microorganismo.

Se realizó también un análisis para verificar si alguna de las características clínicas de los pacientes influían en alguna comunidad específica de microorganismos, pero no se obtuvieron datos significativos.

Discusión :

En nuestro estudio identificamos hasta un 88.8% del total de microorganismos, encontrando mayor cantidad de especies que las reportadas por Li. L y col¹⁸, ellos encuentran 43 especies en total con una muestra de 9 dientes permanentes, Ribeiro Adriana y col¹⁹, en el 2011 encuentran un total de 70 especies con una muestra de 12 dientes permanentes, en estudios con dientes deciduos Chalmers y col²⁰, llegan a encontrar hasta 105 especies, 17 géneros y 5 filos en una muestra de 9 dientes deciduos utilizando un método de pirosecuenciación sin embargo, en éste estudio hemos podido localizar un total de 429 especies, 168 géneros y 9 filos utilizando una muestra de 13 dientes deciduos.

Santos y col²¹, en su estudio para identificar bacterias endodónticas por medio de secuenciación 16S rDNA detectan como el filo mas abundante a los firmicutes y en segundo lugar a los bacteroidetes, y Homg Bo-Young y col²², analizando infecciones endodonticas primarias y secundarias por medio de pirosecuenciación coinciden con nuestros porcentajes encontrando como filo mas abundante a los bacteroidetes con un 29.6% , en segundo lugar a los firmicutes con un 23.2%, y en tercer lugar a las fusobacteria con un 13.1%.

Hay muy pocos estudios de éste tipo que abarquen dientes temporales, Topcuoglu y col. Analizaron la presencia de 10 especies bacterianas en dientes temporales y encontraron en mayor proporción a *F. nucleotum* y *P. intermedia*, coincidiendo con la mayoría de los estudios donde la *P. intermedia* ocupa un porcentaje alto en infecciones endodónticas, Hee Yun Kwan y col.²³ Identifican de la misma manera dientes temporales con infecciones endodónticas, en contraste con nuestros resultados ellos encuentran como mas abundante el filo de las proteobacterias con un 50.4%, seguido de firmicutes y bacteroidetes con un 25.8% y 9.5% respectivamente; en cuanto al género coinciden con nuestros resultados encontrando en gran cantidad *Streptococcus* y *veionella* sin embargo ellos encuentran en mas bajos

porcentajes al género *Prevotella*, en nuestros resultados lo encontramos como mas abundante y coinciden con los estudios previos.

En éste estudio la toma de muestra fue diferente a la reportada en los estudios previos, ya que ha sido reportada con puntas de papel o limas endodónticas, sin embargo nosotros utilizamos una micropipeta y lavados dentro del conducto, esto es importante ya que obtuvimos una cantidad mayor de microorganismos a los que han sido reportados, obtuvimos en altas cantidades microorganismos como *Olsenella*, *Moryella* y *Morococcus* que son microorganismos anaerobios y han sido reportadas en altas cantidades en infecciones de pie diabético o úlceras, y en menores cantidades encontramos *Dialister* y *selenomonas* que también han sido reportadas en infecciones dentales en menores cantidades.

Aún faltan estudios en dientes temporales para poder tener un parámetro de comparación, y esto es importante ya que los microorganismo encontrados son anaerobios estrictos y se están identificando cada vez mas microorganismos resistentes a antibióticos por lo que se debe considerar el tratamiento farmacológico para éstos pacientes, así como la limpieza del conducto en el momento de realizar la pulpectomia. De igual manera faltarían estudios donde se tomen en cuenta algunas otras variables como la raza, los hábitos alimenticios y de higiene, la salud bucodental de los padres etc. Sin embargo, consideramos es importante conocer los microorganismos que están presentes en una infección dental en niños y que podrían causar o agravar una infección persistente en otra área de nuestro organismo.

Referencias:

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ, The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral med Oral Pathol.* 1965 ;38:386-7.
2. Floyd E, Tuste Chen, Jaques I, Bruce J. Paster et al. The Human Oral Microbiome. *J Bacteriol.* Oct 2010: 192(19): 5002-17
3. Group NHW, Peterson J, Garges S. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res* 2009: 19:2317-2323
4. Ricucci D, Candemir GT, Bugea C . Complex Apical Intraradicular Infection and Extraradicular Mineralized Biofilms as the Cause of Wet canals and Treatment Failure: Report of 2 cases. *J Endod.* 2016;42(3):509-15.
5. Gomes BP, 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.
6. Zhang C, Hou BX, Zhao HY, Sun Z. Microbial diversity in failed endodontic root-filled teeth. *Chin Med J (Engl).* 2012;125(6):1163-8.
7. Zakaria MN, Takeshita T, Shibata Y, Maeda H, Wada N, Akamine A, et al. Microbial community in persistent apical periodontitis: a 16S rRNA gene clone library analysis. *Int Endod J.* 2015 Aug;48(8):717-28.

8. Manzur A, Gonzalez A, Pozos A, Silva-Herzog D. Bacterial Quantification in teeth with apical Periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: A randomized clinical trial. *J Endo.* 2007; 33(2):114-18.
9. Buonavoglia A, Latronico F, Pirani C, Greco MF. Symptomatic and asymptomatic apical periododontitis associated with red complex bacteria: clinical and microbiological evaluation. *Odontology.* 2013;101(1):84-8.
10. J.F. Siqueira Jr, I.N. rocas, Diversity of Endodontic Microbiota Revisited. *J Dent Res* 2009; 88(11): 969-981.
11. J.F. Siqueira Jr. N. Rocas. Persistent Endodontic Infections Species Associated with Primary and Uncultivated Phylotypes and Newly Named. *Clin. Microbiol* 2005;43(7):3314-19.
12. Ledezma G, Flores H, González A, Garrocho A. Identification of cultivable Microorganisms from Primary Teeth with Necrotic Pulps. *J Clin Pediatr Dent.* 2010;34(4):329-334.
13. WLF Talavera, LC Neves Brito, RP Teles, MLA Massara. Microbiota of Deciduous Endodontic infection analyzed by MDA and Checkerboard DNA-DNA hybridization. *Int J Endodon* 2011; 44(3):225-35.
14. Hong BY, Lee TK, Lim TK, Chang SW. Microbial analysis in primary and persistent endodontic infections by using pyrosequencing. *J Endod* 2013; 39(9): 1136-40.
15. Tzanetakis GN, Azcarate MA, Zachaki S. Comparison of Bacterial Community Composition of Primary and Persistent Endodontic Infections Using Pyrosequencing. *J Endod* 2015; 41(8):1225-33.

16. Anderson AC, Al-Ahmad A, Elamin F. Comparison of the bacterial composition and structure in symptomatic infections associated with root-filled teeth using pyrosequencing. *Plos One* 2013; 30;8(12)e84960.
17. Rocas IN, Alves FR, Rachid CT. Microbiome of Deep Dentinal Caries Lesions in teeth with symptomatic irreversible Pulpitis. *PLoS One* 2016, 2:11(5) .
18. Li L, Hsiao WW, Nandakumar R, Barbuto SM. Analyzing endodontic infections by deep coverage pyrosequencing. *J Dent Res* 2010; 89(9):980-4.
19. Ribeiro AC, Matarazzo F, Favari M. Exploring bacterial diversity of Endodontic microbiota by cloning and sequencing 16S rRNA. *J Endod* 2011; 37(7):922-6.
20. Chalmers NI, Oh K, Hughes CV. Pulp and plaque microbiota of children with severe early childhood caries. *J Oral Microbiol* 2015; 3:7.
21. Santos AL, Siqueira JF Jr, Rocas IN, Jesus EC. Comparing the bacterial diversity of acute and chronic dental root canal infections. *PloS One* 2011; 6(11)
22. Thimmegowda U, Thomas J, Bilichodmath S. Identification of Specific Anaerobic Bacteria in Endodontic Infections of Primary Teeth-A PCR Study. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2019;12(1):1-4
23. Yun KH, Lee HS, Nam OH, Moon CY. Analysis of bacterial community profiles of endodontically infected primary teeth using pyrosequencing. *Int J. Paediatr Dent*. 2017; 27(1):56-65.
24. Xu Y, Jia YH, Chen L, Metagenomic analysis of oral microbiome in young children aged 6-8 years living in a rural isolated Chinese province. *Oral Dis* 2018 24(6): 1115-1125.
25. Jiang Q, Liu J, Chen L, The oral microbiome in the Elderly with dental caries and health. *Fron Cell Infect Microbiol*. 2019 jan 4;8:442
26. Buonavoglia A, Latronico F, Pirani C, Syntomatic and asyntomatic apical periodontitis associated with red complex bacteria: clinical and microbiological evaluation. *Odontol* 2013; 101(1) 84-8.

27. Shin JM, Luo T, Lee KH, Deciphering Endodontic Microbial Communities by Next-generation sequencing. *J Endod* 2018 44(7):1080-87

