

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Estomatología

Programa de Doctorado en Odontología

TESIS DOCTORAL

**EFECTO ANTIBIÓTICO SOBRE LA DINÁMICA DE
FORMACIÓN DE BIOFILM ENDODÓNTICO**

Doctorando: Álvaro Villanueva Castellote

Directores: M^a Carmen Llena Puy

Alejandro Mira Obrador

Noviembre 2020

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director (es) / Codirector (es):

1.- Apellidos y nombre: Llena Puy, Carmen N.I.F. 17703376-T, Departamento/Instituto: Estomatología Centro: Facultad de Medicina y Odontología

2.- Apellidos y nombre: Mira Obrador, Alejandro N.I.F. 52773306_J, Departamento/Instituto: Centro: Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana

3.- Apellidos y nombre: N.I.F., Departamento/Instituto: Centro:

Tutor o tutora (si procede)

Apellidos y nombre: Llena Puy, Carmen N.I.F. 17703376-T, Departamento/Instituto: Estomatología Centro: Facultad de Medicina y Odontología

Directores/as y tutor/a, respectivamente, de la tesis doctoral: "EFECTO ANTIBIÓTICO SOBRE LA DINÁMICA DE FORMACIÓN DE BIOFILM ENDODÓNTICO"

de D/Dña. Villanueva Castellote, Álvaro,

estudiante del Programa de Doctorado 3143 Odontología (RD99/2011) de la Universitat de València, emiten informe favorable (favorable/desfavorable) para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: 06 de Noviembre de 2020

Fdo.: Carmen Llena

Fdo.: Alejandro Mira

Fdo.:

Fdo.: Carmen Llena

Director/a

Director/a

Director/a

Tutor/a

**ESCOLA DE DOCTORAT
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

Departament d'Estomatologia
C/ Gascó Oliag, 1 46010 VALÈNCIA Tel. 963864144
<http://www.uv.es/estomatologia>
dep.estomatologia@uv.es

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a todas las personas que han hecho posible que esta tesis doctoral se lleve a cabo.

Gracias a mis directores la Dra. Llena y el Dr. Mira, por vuestra implicación y compromiso.

Gracias a Ana, mi eterna compañera de endodoncia, y a Mariam, mi “profe” de laboratorio, vuestra ayuda ha sido imprescindible.

Gracias a mi familia.

Gracias a Andrea, mi compañera de vida, por tu apoyo incondicional.

ÍNDICE

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS	5
INTRODUCCIÓN	6
1. Vías de infección del conducto radicular	7
2. Biopelículas	10
2.1. Efecto de los antibióticos sobre el biofilm.....	13
2.2. Biopelículas de los conductos radiculares	14
3. Crecimiento bacteriano	15
4. Métodos de identificación microbiana	20
5. Composición bacteriana de los conductos radiculares	22
6. Modelos de estudio de biofilm.....	27
6.1. Composición microbiana del biofilm in vitro	28
6.2. Sustrato del modelo de formación de biofilm in vitro	31
6.3. Condiciones de crecimiento.....	32
6.4. Validación del biofilm	33
7. RTCA xCELLigence®	36
8. Antibióticos en endodoncia	38
8.1. Estudios de sensibilidad frente a antimicrobianos	46
Justificación de la presente tesis	49
OBJETIVOS.....	50
METODOLOGÍA.....	51
1. Selección del donante	51
2. Obtención de la muestra.....	53
3. Preparación del medio	53
4. Procesado de la muestra	54
5. Optimización de las condiciones de crecimiento y puesta a punto del sistema RTCA xCELLigence® para muestras de origen endodóntico.....	55
5.1. Determinación de la cantidad mínima de muestra necesaria	55
5.2. Análisis del biofilm en tiempo real. Determinación de la curva de crecimiento.	56
6. Remoción del biofilm de la placa de microtitulación y extracción del ADN	59
7. Amplificación del gen 16S ARN ribosomal y secuenciación	60
9. Análisis estadístico	62

RESULTADOS	63
1. Características clínicas de los pacientes seleccionados.....	63
2. Composición bacteriana de los conductos radiculares	66
2.1. Composición bacteriana general.....	66
2.2. Composición bacteriana intraindividuo	68
2.3. Composición bacteriana de pacientes tras tratamiento antibiótico	70
3. Validación del sistema RTCA xCelligence® para muestras de origen endodóntico	73
4. Efecto in vitro de diferentes antibióticos.....	77
4.1. Patrones de crecimiento	77
4.2. Composición bacteriana según el patrón de crecimiento del biofilm	82
4.3. Efecto antibiótico sobre la composición bacteriana.....	90
4.4. Efecto antibiótico intraindividuo sobre la formación de biofilm.....	97
4.5. Efecto antibiótico intraindividuo sobre la composición bacteriana	99
5. Correlación entre los datos clínicos y el efecto antibiótico.....	105
DISCUSIÓN	108
CONCLUSIONES FINALES	117
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118
ANEXOS.....	131

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS

- AAE: Asociación Americana de Endodoncia.
- ADA: Asociación Dental Americana.
- AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.
- BHI: Brain Heart Infusion (Infusión Cerebro-Corazón).
- CCA: análisis canónico de correspondencia.
- CFUs: Unidades formadoras de colonias (Colony Forming Unit).
- CI: Cell Index, Índice Celular.
- ESE: Sociedad Europea de Endodoncia.
- HM: Hemina Menadiona.
- Med: Medio de cultivo (BHI suplementado con hemina menadiona y vitamina K).
- MedA: Medio de cultivo con amoxicilina – ác. clavulánico a una concentración de 8µg/mL.
- MedAztr: Medio de cultivo con Azitromicina a una concentración de 0,4 µg/mL.
- MedMtr: Medio de cultivo con Metronidazol a una concentración de 16µg/mL.
- PBS: Phosphate Buffered Saline, tampón fosfato salino.
- Rpm: revoluciones por minute.
- RTCA xCELLigence®: Real-Time Cell Analyzer xCELLigence®.
- VitK: Vitamina K.

INTRODUCCIÓN

El microbioma humano representa al conjunto de microorganismos con sus elementos genéticos y las interacciones que establecen con el medio ambiente en el que se encuentran. La microbiota es un elemento importante para el correcto funcionamiento de algunos órganos, habiéndose demostrado que participa en la patogenia de algunas enfermedades (Dethlefsen et al., 2007). En más de la mitad de las infecciones crónicas que responden mal a los tratamientos antibióticos y no pueden prevenirse mediante inmunización, los microorganismos implicados crecen adheridos sobre los tejidos formando comunidades de bacterias a las que se les ha denominado biofilms o biopelículas (se utilizarán como sinónimos a lo largo del texto) (Stoodley et al., 2002). Ejemplos de estas infecciones son: los cálculos renales infecciosos, la endocarditis bacteriana, las infecciones de la vía aérea en pacientes que padecen fibrosis quística, la caries dental, las enfermedades periodontales o la periodontitis apical (Parsek & Singh, 2003).

La periodontitis apical es una enfermedad inflamatoria de etiología microbiana debida a la infección de los conductos radiculares (Siqueira & Rôças, 2008; Siqueira & Rôças, 2009). Como consecuencia de la progresión de la caries, de un traumatismo, de una extensa afectación periodontal o por iatrogenia se produce una necrosis de la pulpa. En estas circunstancias de ausencia de defensas del huésped en el interior de los conductos radiculares, éstos son colonizados por microorganismos que avanzan a través del sistema de conductos hasta entrar en contacto con los tejidos perirradiculares a través de los forámenes apicales o laterales. Como respuesta de los mecanismos de defensa del huésped se desencadena un proceso inflamatorio que da origen a la periodontitis apical (Hargreaves & Cohen, 2011).

La periodontitis apical crónica o asintomática (sin dolor) (Siqueira & Rôças, 2009) está asociada a una agresión persistente de tejidos por parte de microorganismos con baja virulencia, pero organizados en biopelículas que los hace inaccesibles para las defensas del huésped. Así pues, la principal causa de la periodontitis apical crónica es la persistencia de microorganismos en el sistema de conductos radiculares (Costerton, 2007). Otras causas de periodontitis apical asintomática pueden ser la infección extrarradicular (principalmente por actinomicosis), las respuestas del organismo relacionadas con el material de obturación (gutapercha o cementos de obturación) o la acumulación de cristales de colesterol endógenos asociados con lesiones quísticas verdaderas y tejido de cicatrización (Ricucci et al., 2006).

En cambio, la periodontitis apical aguda o sintomática (dolor intenso e hinchazón) (Siqueira y Rôças, 2009) se relaciona con la presencia de bacterias muy virulentas, en estado planctónico, con una alta tasa de crecimiento y con capacidad de invadir tejidos. Esta alta virulencia puede ser debida a la presencia de cepas bacterianas muy virulentas o a la aparición de sinergismo entre especies. En el caso de algunas bacterias se ha demostrado que los genes que codifican los factores de virulencia se expresan en mayor proporción en estado planctónico que formando parte de un biofilm (Furukawa et al., 2006, Hargreaves & Cohen, 2011; Siqueira & Rôças, 2009), debido a que muchos genes de enzimas y toxinas se desactivan cuando las bacterias forman parte de una biopelícula, pudiendo volver a activarse en caso de pasar a forma planctónica (Costerton, 2007).

1. VÍAS DE INFECCIÓN DEL CONDUCTO RADICULAR

La necrosis pulpar puede ser causada por factores térmicos, químicos, traumáticos o por invasión bacteriana. La caries dental es la causa más frecuente, la cual produce destrucción de los tejidos duros del diente llegando a colonizar la pulpa dental (Brook, 2003).

En condiciones normales, el complejo dentino-pulpar es estéril. La dentina es una estructura permeable, debido a la presencia de los túbulos dentinarios (Hargreaves & Cohen, 2011). Los túbulos dentinarios tienen un diámetro medio de 2,5 μ m en el extremo próximo a la pulpa, este diámetro se reduce progresivamente hasta los 0,9 μ m de diámetro en la porción cercana al esmalte o cemento (Garbeoglio, 1976).

Cuando se pierde la protección del esmalte o del cemento dental, las bacterias orales cuyo tamaño oscila entre 0,2 y 0,7 μ m podrían colonizar los túbulos dentinarios hasta llegar a la pulpa. Sin embargo, en dientes vitales la invasión del complejo dentino-pulpar se encuentra frenada por varios factores: por una parte la permeabilidad de los túbulos dentinarios es reducida drásticamente debido a la presencia de las prolongaciones odontoblásticas y a la formación de dentina terciaria (Michelich et al., 1978; Pashley, 1996); por otra parte, la capacidad defensiva del hospedador mediante anticuerpos y componentes del sistema del complemento, presentes en el fluido dentinario, van a contribuir a frenar o impedir la progresión bacteriana (Ackermans et al., 1981, Okamura et al., 1979; Okamura et al., 1980). En caso de necrosis pulpar estos factores se verían disminuidos permitiendo la invasión bacteriana (Siqueira & Rôças, 2008). Se han aislado bacterias en pulpas necróticas debido a la sección del

paquete vasculonervioso por causa de un traumatismo sin exposición pulpar (Wittgow, 1975; Sundqvist, 1976).

Las bacterias pueden entrar en contacto con la pulpa a través de una exposición directa debido a la progresión de la caries, traumatismos o procedimientos iatrogénicos restauradores. En la mayoría de los casos tras una exposición pulpar la pulpa se inflamará y necrosará (Cvek et al., 1982). La pulpa también se necrosará en caso de enfermedad periodontal avanzada, en la que la bolsa periodontal alcanzará el foramen apical provocando daños irreversibles en los vasos sanguíneos que irrigan la pulpa (Langeland et al., 1974).

Tras la colonización de los túbulos dentinarios, a medida que las bacterias avanzan por el sistema de conductos radiculares, las condiciones ambientales se irán modificando, lo que permitirá la colonización por parte de otras bacterias. Con el paso del tiempo la microbiota se va organizando estructural y espacialmente en función de diferentes factores como son la disponibilidad de oxígeno y nutrientes además de las interacciones entre especies (Yamasaki et al., 1994; Hargreaves & Cohen, 2011).

De acuerdo con la clásica clasificación de Seltzer et al. (1963) la pulpa dental puede presentar los siguientes cambios histológicos tras una infección: 1) Pulpa intacta no inflamada (Intact un-inflamed pulp IUP): no se observan cambios significativos en las células, los vasos sanguíneos y la capa odontoblástica están intactos. 2) Pulpitis hiperémica (Hyperemic pulpitis HP): los vasos sanguíneos se encuentran dilatados y existe congestión sanguínea, tienen lugar cambios leves en la capa odontoblástica pero sin signos de células inflamatorias. 3) Pulpitis transitoria (Transient pulpitis TP): se observan células inflamatorias crónicas como macrófagos, linfocitos y células plasmáticas en el tejido pulpar sin presencia de exudado inflamatorio. 4) Pulpa retrogresiva (Retrogressive pulp RP): el tejido pulpar es atrófico, el número y tamaño de las células pulpares (odontoblastos y fibroblastos) han disminuido, hay un aumento de fibras de colágeno y formación de dentina reparadora pero las células inflamatorias crónicas no son predominantes. 5) Pulpitis parcial crónica (Chronic partial pulpitis CPP): presencia de exudado inflamatorio crónico de la pulpa a nivel local, la inflamación se limita a la zona coronal sin extenderse a la pulpa radicular. Existen una disposición irregular de los odontoblastos y una vacuolización diseminada o local, así como congestión de los vasos sanguíneos y zonas de calcificación. 6) Pulpitis total crónica (Chronic total pulpitis CTP): el grado de inflamación es similar al del grupo anterior, pero en este caso están involucradas tanto la pulpa cameral como la radicular. 7) Necrosis parcial (Partial necrosis PN): no se observa tejido vital o celular en la zona coronal, existe una inflamación severa con infiltración abundante de células inflamatorias

en la pulpa radicular. 8) Necrosis total (Total necrosis TN): no se encuentran signos de odontoblastos en toda la pulpa, los vasos sanguíneos se han destruido por completo y las células inflamatorias se están desintegrando.

Ricucci et al. (2014) evaluaron la correlación entre la sintomatología clínica y el estado histológico de la pulpa, estableciendo tres niveles de afectación: 1) Enfermedad pulpar reversible: en el que se incluían muestras con pulpas no inflamadas y pulpas atróficas. La pulpa atrófica parece menos celular que la pulpa sana joven, con menos fibroblastos pero una mayor cantidad de haces de colágeno. La capa odontoblástica se puede reducir y aplanar. Se pueden ver islas de calcificación en todo el tejido pulpar, con capas gruesas de dentina terciaria que reducen el volumen del espacio pulpar. También se incluyeron muestras con evidencia de inflamación crónica moderada confinada a la pulpa coronal. En estos casos, los linfocitos y las células plasmáticas se ven reunidos en concentraciones moderadas debajo de las áreas más profundas de penetración de caries, pero no oscurecen la arquitectura normal. Las áreas de necrosis de coagulación o licuefacción, así como las bacterias, están ausentes. 2) Enfermedad pulpar irreversible: presencia de necrosis parcial o total de la pulpa coronal. Al menos en una zona, aunque sea pequeña, el tejido pulpar ha sufrido licuefacción o coagulación, rodeado de masas de neutrófilos polimorfonucleares. Periféricamente, las concentraciones de células inflamatorias crónicas (linfocitos, células plasmáticas y macrófagos) forman un halo denso alrededor de estas zonas centrales de absceso. Se observan agregaciones bacterianas / biopelículas que colonizan el tejido pulpar necrótico o las paredes de dentina adyacentes. Se registró la presencia / ausencia de una comunicación directa entre la cavidad de caries y la cámara pulpar (es decir, perforación). 3) Pulpa sana: la pulpa no presenta cambios en el complejo dentina / predentina / odontoblastos. También se observan túbulos dentinarios que corren paralelos entre sí a través de dentina y predentina sin reducción en los números. No hay reducción de la capa de odontoblastos ni del tamaño de las células de odontoblastos. La dentina terciaria y otras calcificaciones están ausentes. No hay acumulaciones de células inflamatorias, vasos dilatados o bacterias presentes. En su estudio concluyó que existía una alta correlación entre los criterios clínicos e histológicos de las afecciones pulpares, especialmente para los casos sin enfermedad o enfermedad reversible. Sin embargo, hoy por hoy no se dispone de evidencia científica suficiente que permita correlacionar con precisión los signos y síntomas clínicos y las pruebas de sensibilidad con el estado histológico pulpar y permitan determinar si nos hallamos ante una situación de pulpitis reversible o irreversible (Mejàre et al., 2012).

2. BIOPELÍCULAS

Se puede definir un ecosistema microbiano como el sistema funcional que se mantiene a sí mismo, constituido por una comunidad microbiana y su entorno (hábitat). Una comunidad es considerada como el conjunto de poblaciones (microcolonias) que coexisten e interactúan en un entorno determinado. Un conducto radicular infectado albergaría una comunidad microbiana compuesta por varias microcolonias. Cada población ocupa un nicho (rol funcional) que contribuye a la comunidad manteniendo el equilibrio ecológico del ecosistema. El número de nichos es limitado, por lo que serán ocupados por las poblaciones bacterianas más competentes. Las comunidades bacterianas estructuradas y organizadas pueden dotar a la misma de propiedades que las bacterias de forma individual no presentan (Siqueira & Rôças, 2009; Hargreaves & Cohen, 2011).

Una biopelícula o biofilm consiste en una comunidad microbiana multicelular sésil que se une firmemente a una superficie, inmersa en una matriz extracelular (polisacáridos) sintetizada por las propias células de la comunidad. Además, muestra un fenotipo alterado con respecto a la tasa de crecimiento y transcripción de genes, con una tasa metabólica generalmente reducida (Donlan & Costerton 2002; Costerton, 2007,).

Caldwell et al. (1997) propusieron 4 características que debía poseer toda biopelícula: 1) Autopoiesis: la biopelícula debe ser capaz de autoorganizarse. 2) Homeostasis: debe resistir las perturbaciones ambientales. 3) Sinergia: debe ser más eficaz formando biofilm que de forma planctónica. 4) Comunalidad: debe responder a los cambios ambientales de forma conjunta como una unidad, no de forma individual.

Conforme la biopelícula va madurando se va sintetizando la matriz extracelular, la cual está compuesta principalmente por polisacáridos y en menor medida por proteínas y ácidos nucleicos (Stoodley et al., 2002; Hall-Stoodley et al., 2004). La matriz extracelular ocupa hasta el 85% del biofilm, siendo un 15% del volumen las bacterias agrupadas en microcolonias (Sutherland, 2001; Donlan & Costerton, 2002). Estas microcolonias suelen estar constituidas por más de una especie y pueden llegar a formar hasta 300 capas de células de espesor (Socransky & Haffajee, 2002)

Las poblaciones o microcolonias forman una compleja comunidad microbiana que tiene una homeostasis y un sistema circulatorio primitivo cuyo líquido transporta nutrientes, residuos metabólicos y moléculas de señalización (Costerton, 1995; Jhajharia et al., 2015), lo cual ha sido confirmado recientemente por microscopía (Rooney et al., 2020).

Kolenbrander (2000) representó en forma de diagrama la estructura de un biofilm oral sobre la superficie del esmalte (figura I.1). Las flechas amarillas representan el flujo salivar en un medio supragingival o el fluido crevicular en un medio subgingival. Se observan bacterias individuales y coagregados (interacción física entre bacterias suspendidas) en forma planctónica. *Streptococcus* y *Actinomyces* se encuentran entre las bacterias colonizadoras de la superficie dental, cuya interacción con el substrato ayuda a formar un biofilm temprano. Sin embargo, el *Fusobacterium* se relaciona con la formación de coagregados celulares y con la formación de un ambiente anaeróbico que posibilita la presencia de anaerobios estrictos en coagregados presentes en un ambiente aeróbico. Por último, puede tener lugar la cohesión (interacción física entre bacterias suspendidas y adheridas) entre bacterias o coagregados en fase planctónica con las bacterias ya adheridas.

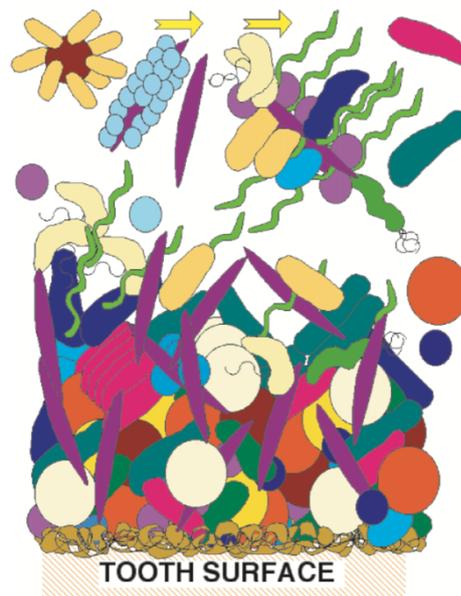


Figura I.1. Representación de la estructura del biofilm sobre la superficie dental. Las flechas amarillas representan el flujo salivar. La superficie del diente está recubierta con una película adquirida derivada del huésped (malla dorada rizada en la parte inferior) a la que se unen bacterias genéticamente distintas representadas por colores diferentes. También se observan células y coagregados en forma planctónica. Imagen obtenida de Kolenbrander (2000).

Además, las últimas técnicas de microscopía de fluorescencia indican que los biofilms orales están mucho más estructurados de lo que inicialmente se sospechaba, con especies que sirven de base para la adhesión de otras y con interacciones específicas entre especies que se suministran metabolitos para su crecimiento conjunto (Ferrer & Mira 2016).

Las interacciones entre las microcolonias que conforman la biopelícula dotan a la comunidad microbiana de propiedades y funciones fisiológicas que no pueden observarse en

cada componente de forma individual (Marsh, 2005; Hargreaves & Cohen, 2011). Por una parte, las bacterias colonizadoras van a modificar el hábitat reduciendo la tensión de oxígeno, lo que va a permitir la incorporación de bacterias anaerobias. Además, tiene lugar un aumento de la eficiencia metabólica de las diferentes poblaciones microbianas, ya que los residuos metabólicos de unas se convierten en nutrientes de otras. Por otra parte, algunas bacterias van a secretar enzimas (betalactamasas, catalasas, proteinasas), metabolitos y bacteriocinas que confieren protección frente antimicrobianos, defensas del huésped y otras especies competidoras. La organización bacteriana en forma de biofilm también va a permitir el intercambio genético mediante conjugación, transformación y transducción (Mira, 2007). Esto constituye la principal causa de adquisición y diseminación de virulencia y resistencias frente a los antibióticos. (Brook, 1986; Hargreaves & Cohen, 2011; Neelakantan et al., 2017).

Las diferentes combinaciones bacterianas pueden dar lugar a una mayor virulencia debido al sinergismo (Sundqvist et al., 1979; Baumgartner et al., 1992, Feuille et al., 1996, Kesavalu et al., 1998). Especies bacterianas que por sí solas tienen una baja virulencia y no pueden causar enfermedad pueden hacerlo al formar parte de una biopelícula (Sundqvist, 1976; Brook, 1986; Siqueira & Rôças, 2009).

Durante el proceso de formación de la biopelícula se van a ver involucrados tres componentes: las células bacterianas, un medio fluido y una superficie sólida. Primero se formará una capa de acondicionamiento mediante la adsorción de moléculas inorgánicas y orgánicas sobre la superficie sólida, es lo que se conoce como película adquirida. A continuación, microorganismos en forma planctónica se irán adhiriendo a la capa de acondicionamiento. Finalmente, colonizadores secundarios se unirán a los iniciadores y tendrá lugar el crecimiento bacteriano y la expansión del biofilm (Kolenbrander, 2000; Jhajharia et al., 2015). A medida que la biopelícula va madurando, su estructura y composición se ve modificada en función de las condiciones ambientales (disponibilidad nutricional y de oxígeno) (Donlan & Costerton, 2002)

Diferentes autores han definido una serie de criterios que una enfermedad debe cumplir para que se considere causada por biofilm: 1) Las bacterias infectantes están adheridas o asociadas con una superficie (el término “asociado” permite la inclusión de agregados no firmemente adheridos). 2) El examen directo de tejido infectado muestra bacterias que forman agrupaciones o microcolonias encerradas en una matriz extracelular, esta matriz puede ser de origen bacteriano o del propio huésped. 3) La infección generalmente se limita a un sitio en particular y, aunque puede ocurrir una diseminación, es un evento secundario. 4) La infección

es difícil o imposible de erradicar con antibióticos a pesar del hecho de que los microorganismos responsables son susceptibles de ser eliminados en el estado planctónico (Parsek & Singh, 2003). 5) Aclaramiento ineficaz del huésped evidenciado por la ubicación de agrupaciones de células bacterianas (macrocolonias) en áreas discretas del huésped asociadas con células inflamatorias (Hall-Stoodley & Stoodley, 2009). 6) La eliminación o la interrupción significativa de la estructura y la ecología de la biopelícula conduce a la remisión del proceso de la enfermedad (Ricucci & Siqueira, 2010).

2.1. Efecto de los antibióticos sobre el biofilm

En la literatura se utilizan los términos “resistencia”, “tolerancia” y “persistencia” para hablar de la disminución de susceptibilidad o sensibilidad de los microorganismos frente a los antimicrobianos, pero no existe un consenso en cuanto al significado de éstos (Hall & Mah, 2017).

La resistencia a los antibióticos se define como un aumento de la concentración mínima inhibitoria (MIC, concentración más baja de antimicrobiano que inhibe el crecimiento del microorganismo) a causa de un cambio permanente en la bacteria, como ocurre en las mutaciones y en la adquisición de resistencias a través de la transferencia horizontal de genes (Mah, 2012; Olsen et al., 2015).

Para algunos autores la diferencia entre resistencia y tolerancia erradica en que la resistencia hace referencia sólo a un antibiótico o tipo de antibiótico en concreto (Yan & Bassler. 2019). En cambio, otros autores diferencian estos términos en que la tolerancia es provocada por un cambio fenotípico reversible (Mah, 2012; Olsen et al., 2015).

Por último, algunos autores denominan bacterias persistentes a aquellas que son menos susceptibles a los antimicrobianos debido a la diferenciación fenotípica (Balaban et al., 2004; Lewis, 2005; Yan & Bassler. 2019)

Los microorganismos presentes en un biofilm son hasta 100 veces más resistentes a los antibióticos que de forma planctónica (Ceri et al., 1999). Esta menor susceptibilidad probablemente es debida a la acción conjunta de diferentes mecanismos como son: la matriz extracelular, tasa de crecimiento lento, metabolismo alterado, presencia de células persistentes y gradientes de oxígeno y nutrientes (Olsen, 2015).

Inicialmente se propuso que la resistencia antibiótica del biofilm era causada por la disminución de penetración del antimicrobiano a través de la matriz extracelular. Actualmente, esta afirmación no explica el aumento de resistencia de la biopelícula frente a la mayoría de los

antimicrobianos (Walters et al., 2003; Hall & Mah, 2017; Yan & Bassler, 2019). Además, la difusión del antibiótico parece ser variable según la configuración experimental, la cepa bacteriana y las condiciones de crecimiento de la biopelícula (Hall & Mah, 2017). Se puede evitar la penetración del antibiótico si éste se une a los componentes de la matriz extracelular (Chiang et al., 2013; Olsen, 2015). Los antimicrobianos pueden ser inactivados por la presencia en la matriz extracelular de enzimas como β -lactamasas (Anderl et al., 2000, Hall & Mah, 2017) o ADN extracelular, el cual está cargado negativamente y puede actuar como quelante de los antimicrobianos catiónicos o como escudo frente a los aminoglucósidos (Mulcahy et al., 2008; Chiang et al., 2013). La matriz extracelular también proporciona una barrera física que protege a las células de los componentes del sistema inmune (Lewis, 2005).

El aumento de la tolerancia del biofilm está relacionado con la alteración de la fisiología de las células que lo componen. Existen zonas dentro de la biopelícula en las que, a causa del consumo de las células periféricas, la penetración de oxígeno y nutrientes está limitada (Stewart et al., 2016). Esta situación provoca que las bacterias entren en fase estacionaria en la que hay una baja actividad metabólica (Anderl et al. 2003; Walters et al., 2003; Borriello et al. 2004). Estas bacterias en fase estacionaria son menos susceptibles a los antibióticos, ya que muchos de ellos están dirigidos a procesos que ocurren en bacterias en crecimiento, como la replicación, transcripción y síntesis de la pared celular (Olsen, 2015).

Por último, cabe destacar que la alta densidad bacteriana del biofilm disminuye la sensibilidad a los antibióticos debido a la mayor frecuencia de mutación y mejor transferencia horizontal de genes (Molin & Tolker-Nielsen 2003; Driffield et al., 2008; Høiby et al., 2010)

2.2. Biopelículas de los conductos radiculares

Ricucci & Siqueira (2010) analizaron histológicamente 64 muestras procedentes de dientes sin tratar con periodontitis apical. Encontraron presencia de bacterias en todas menos en una muestra. Estas bacterias se encontraban formando una biopelícula en el tercio apical en el 80% de los casos, observándose también en ramificaciones e istmos. Fue frecuente observar todo el tercio apical cubierto por una biopelícula en casos de presencia de caries muy extensas o necrosis de larga evolución. En prácticamente todas las muestras se observaron flóculos y células planctónicas flotantes o en relación con tejido necrótico en el lumen del conducto radicular, ramificaciones e istmos. Estos flóculos pudieron haberse originado a partir de agregados celulares o haberse desprendido del biofilm (Hall-Stoodley & Stoodley, 2009). Además, estos flóculos suelen presentar muchas de las características de las biopelículas (Hall-

Stoodley et al., 2004). También se pudo observar que la invasión bacteriana penetraba a diferentes profundidades de los túbulos dentinarios (Ricucci & Siqueira, 2010).

Ricucci & Siqueira (2010) visualizaron biofilm en el 59% de los casos con áreas radiolúcidas ≤ 5 mm y en el 87,5% de los casos con áreas radiolúcidas > 5 mm. La prevalencia general de biopelículas en quistes, abscesos y granulomas fue del 95%, 83% y 69,5% respectivamente, existiendo una relación significativa con las lesiones epitelizadas. En cambio, no se encontró correlación entre las biopelículas y los síntomas clínicos o la presencia de fistula. Por todo esto, concluyeron que la periodontitis apical puede ser considerada una enfermedad inducida por biofilm (Ricucci & Siqueira, 2010).

En cuanto a la morfología del biofilm del interior de los conductos radiculares, Ricucci & Siqueira (2010) observaron que solía tener varias capas de células bacterianas formadas por cocos, bacilos y filamentos. Estos morfotipos podían encontrarse en proporciones variables en el mismo biofilm, pero solía haber uno predominante. La proporción hallada entre células bacterianas y matriz fue muy variable: en unos casos había una gran abundancia de células bacterianas donde prácticamente no se observaba matriz extracelular, en cambio en otros el componente extracelular era muy predominante. También fue muy variable la disposición celular, en unas biopelículas las células eran abundantes en las capas más profundas y en otras en las capas más superficiales.

Algunos autores afirman que no se debe centrar el tratamiento de una enfermedad provocada por un biofilm en una especie en concreto (Mira, 2018), sino que se debe dirigir los esfuerzos al desequilibrio y desestructuración de la biopelícula (Siqueira & Rôças, 2009). Siguiendo este enfoque y dado que el biofilm endodóntico es polimicrobiano, podrían utilizarse combinaciones de antimicrobianos como las bacteriocinas producidas por el probiótico *Streptococcus dentisiasi* para combatir las infecciones endodónticas (Llena et al., 2019) o estrategias antimicrobianas de amplio espectro. Asimismo, las pruebas de inhibición *in vitro* centradas en especies concretas pueden no ser representativas de la sensibilidad global del biofilm, ya que éste está formado por decenas o incluso cientos de especies bacterianas diferentes (Mira et al., 2019).

3. CRECIMIENTO BACTERIANO

En condiciones favorables, una población microbiana unicelular en crecimiento se duplica a intervalos regulares de tiempo, ya que cada una de las dos células hijas resultantes de

una división tienen el mismo potencial de crecimiento que la célula madre. El tiempo que tarda una población microbiana en duplicar su número de células se conoce como tiempo de generación. La tasa de crecimiento de un cultivo bacteriano depende de la especie bacteriana, de la composición química del medio (nutrientes, pH) y la temperatura (figura I.2).

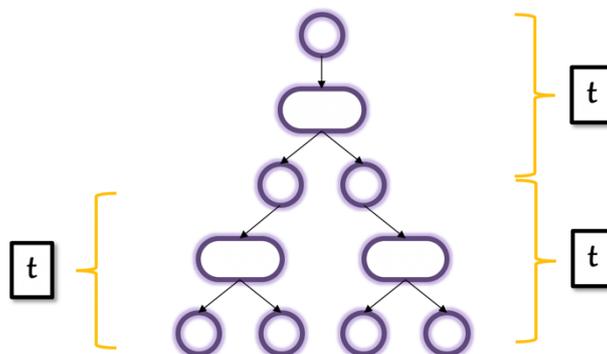


Figura I.2. Representación de la multiplicación de una célula madre en sucesivas células hijas. t = tiempo de generación.

La medición del crecimiento bacteriano mediante conteo de colonias o medición de la turbidez en un medio líquido sin renovación de nutrientes dibuja una gráfica que consta de las fases que se describen a continuación y se esquematizan en la figura I.3. La primera fase del crecimiento bacteriano es la **fase de adaptación** (latencia), en la que no se observa un aumento en el número de bacterias, por lo que se le ha llamado de crecimiento lento. En cambio, sí se observa una alta actividad metabólica con formación de productos intermedios. En la **fase logarítmica** (exponencial) el crecimiento bacteriano dibuja una línea ascendente en la gráfica. Constituye la máxima velocidad de multiplicación de una especie. A continuación, el crecimiento bacteriano entra en la **fase estacionaria**, en la que no se observa aumento del número de bacterias vivas. En esta etapa los nutrientes se están agotando y los productos de desecho metabólicos se acumulan. Finalmente, el crecimiento bacteriano entra en la **fase de declinación** (muerte), en la que se observa un mayor número de bacterias muertas que de bacterias viables (Ryan & Ray 2017; Romero, 2018).

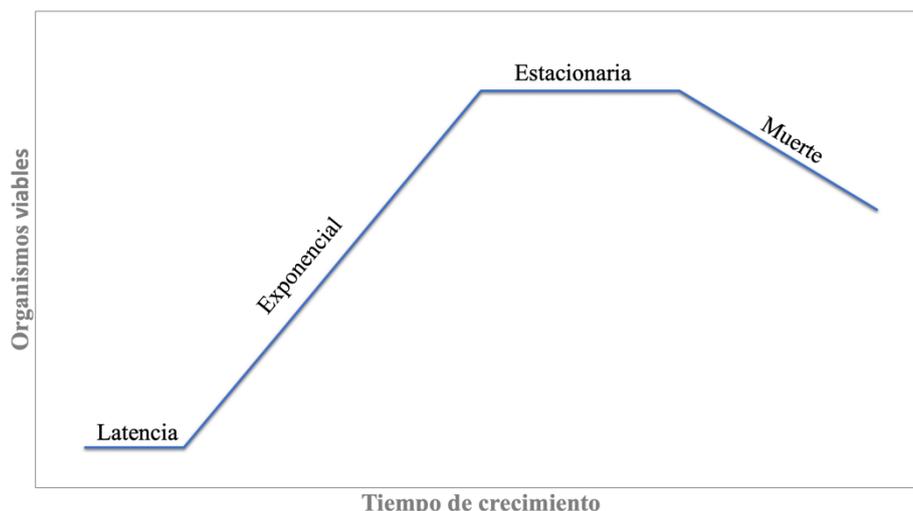


Figura I.3. Curva de crecimiento de biofilm. Fases del crecimiento bacteriano en un medio líquido sin renovación de nutrientes.

En el caso del crecimiento de los biofilms se pueden distinguir tres etapas distintas: unión de las células a una superficie, crecimiento de las células en una biopelícula y por último, desprendimiento de éstas al medio circundante (Kaplan, 2010), este crecimiento se esquematiza en la figura I.4.

Concretamente en el biofilm dental, primero se forma por adsorción una fina capa de proteínas derivadas de las glucoproteínas salivales sobre la superficie sólida del diente. Esta primera capa se denomina película adquirida (capa acondicionadora), que altera las propiedades físicas y químicas del diente (Kisehen & Haapasalo, 2010; Huang, et al., 2011).

A continuación, tiene lugar la adhesión de bacterias a la superficie dental. La primera interacción bacteria-superficie va a ser una unión reversible determinada por las propiedades físicas y químicas (superficie de energía y densidad de carga) de ambos. Posteriormente la unión se fortalece mediante adhesinas específicas ubicadas en estructuras como flagelos, fimbrias y pilis (Kaplan, 2010; Kisehen & Haapasalo, 2010; Huang, et al., 2011).

En la siguiente etapa bacterias colonizadoras secundarias se unen a receptores de superficie de las bacterias colonizadoras primarias. Simultáneamente las bacterias se multiplican y forman la matriz extracelular que ayuda a las bacterias a mantenerse unidas. Debido al crecimiento y maduración del biofilm se crean condiciones ambientales de pH, cantidad de oxígeno y disponibilidad de nutrientes que permiten la colonización del biofilm por parte de otras bacterias, como anaerobias estrictas (Kaplan, 2010; Huang, et al., 2011).

Finalmente, en un biofilm maduro tiene lugar la desagregación de células bacterianas o coagregados del biofilm. La dispersión bacteriana va a contribuir a la diseminación y

supervivencia bacteriana y a la transmisión de la enfermedad. Existen dos causas principales de diseminación: limitación de nutrientes en el biofilm maduro, por lo que las bacterias buscan nuevas localizaciones para su crecimiento; y la acción de las defensas del huésped en intento de contener el crecimiento del biofilm, como por ejemplo la dispersión por la fuerza del flujo salival (Kaplan, 2010; Huang, et al., 2011).

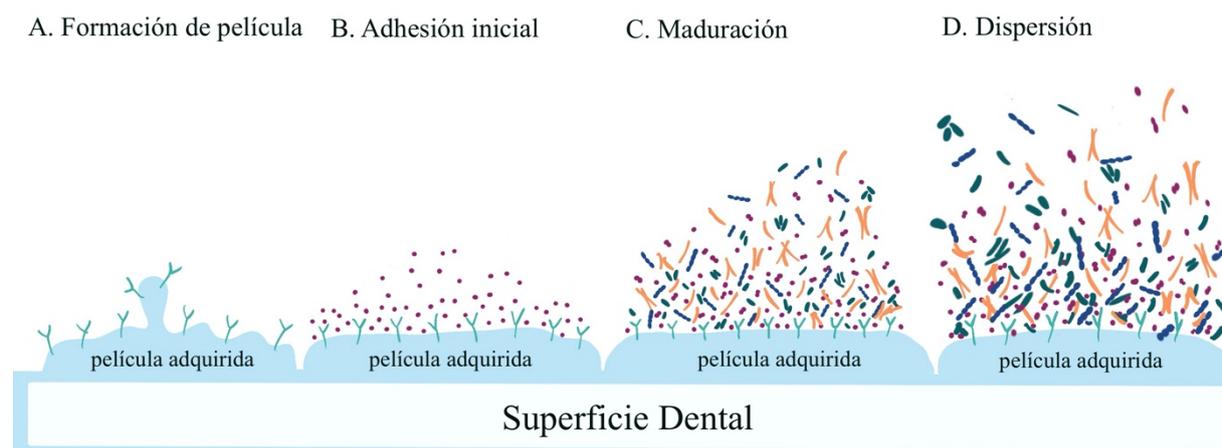


Figura I.4. Representación de las etapas de formación de una biopelícula oral. A) Película adquirida. B) adhesión de las bacterias colonizadoras. C) Maduración del biofilm. Formación de coagregados de diferentes bacterias. D) Dispersión. Las bacterias se desagregan de la superficie del biofilm para colonizar una nueva localización (Huang et al., 2011)

Aunque el biofilm teóricamente sufre unas fases similares de desarrollo a las de los cultivos bacterianos, no se han podido ver de forma continua, como en las curvas de crecimiento de los cultivos bacterianos puros, hasta la aparición y desarrollo de los métodos de impedancia. Éstos han revolucionado el estudio de la dinámica de las biopelículas, y han mostrado que efectivamente, estas fases pueden ser observadas en el desarrollo de un biofilm multiespecie. Además, los patrones de dinámica de formación varían según el origen de la muestra (por ejemplo, saliva, placa subgingival o lengua), siendo similares para el mismo tipo de muestra de diferentes individuos, tal como se muestra en la figura I.5 (Mira et al., 2019). Hasta el momento no se ha puesto a punto el crecimiento y cuantificación de biofilms de origen endodóntico por esta metodología de monitorización en tiempo real por impedancia.

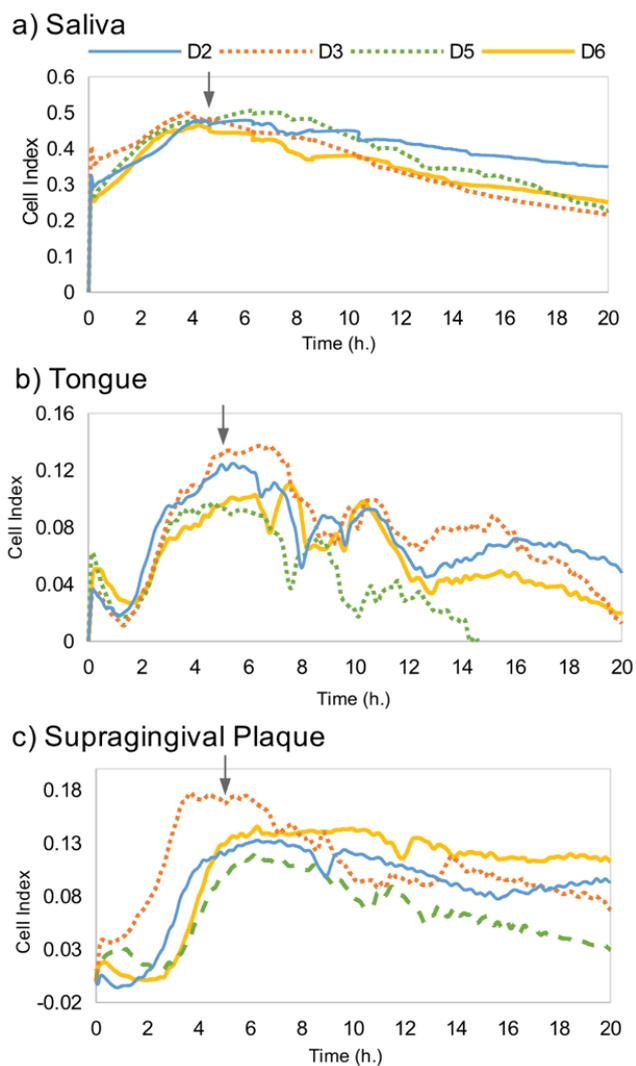


Figura I.5. Dinámica de formación de biopelículas de muestras orales de tres nichos diferentes a) saliva, b) lengua y c) placa supragingival, de cuatro voluntarios (D2, D3, D5 y D6) (Mira et al., 2019).

4. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN MICROBIANA

El cultivo es el método utilizado tradicionalmente para la caracterización de la composición microbiana. Tras la recogida y transporte de la muestra al laboratorio en un medio adecuado, se somete a agitación mediante sonicación o vórtex y posterior dilución para distribuirla en diferentes tipos de medios agar cultivados en condiciones aerobias y anaerobias. Tras un tiempo de incubación, las diferentes colonias obtenidas se subcultivan para su correcta identificación. Ésta se lleva a cabo en función de la morfología de la colonia, la tinción gram, la tolerancia al oxígeno, los productos finales del metabolismo (cromatografía de gases-líquidos) y también mediante la identificación de proteínas de la membrana celular (electroforesis en gel) y fluorescencia. El cultivo es un método fácilmente disponible que además permite determinar la sensibilidad antimicrobiana. En cambio, es un método laborioso que depende de la experiencia del microbiólogo y que sólo permite identificar aquellos microorganismos que son cultivables (Hargreaves & Cohen, 2011). Entre el 50 y el 60% de las bacterias que se encuentran en la cavidad oral no son cultivables (Aas et al., 2005; Kumar et al., 2005).

Por otro lado, las técnicas de biología molecular permiten identificar los microorganismos que componen una muestra sin necesidad de llevar a cabo un cultivo. El gen ARN ribosomal 16S es el más utilizado para la identificación bacteriana porque se distribuye universalmente entre todas las bacterias, aporta gran cantidad de información y es suficientemente pequeño para ser secuenciado con facilidad. Este gen puede amplificarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores universales (de amplio espectro) (Hargreaves & Cohen, 2011). Gracias a los abordajes moleculares se han identificado como patógenos endodónticos bacterias difíciles de cultivar o aún no cultivadas. Se han detectado más de 400 especies en diferentes infecciones endodónticas, de las cuales el 45% se han descrito exclusivamente mediante biología molecular. A la hora de analizar los resultados obtenidos con este tipo de técnicas se debe tener en cuenta que detectan tanto microorganismos vivos como muertos (Siqueira & Rôças, 2005b).

Entre las técnicas de biología molecular se describen: electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE, *denaturing gradient gel electrophoresis*), polimorfismo de la longitud del fragmento terminal de restricción (T-RFLP, *terminal restriction fragment length polymorphism*), hibridación in situ con fluorescencia (FISH, *fluorescence in situ hybridization*), sondas de hibridación ADN-ADN y PCR cuantitativa (qPCR) entre otras (Hargreaves y Cohen, 2011). Actualmente, estas técnicas moleculares tradicionales están siendo reemplazadas por

técnicas de secuenciación de segunda generación como la pirosecuenciación 454 (Roche Applied Science, Basel, Switzerland), ya retirada del mercado por parte del fabricante, y la secuenciación Illumina (Hamady & Knight, 2009).

Hoy en día, la plataforma Illumina MiSeq (figura I.6) se utiliza de forma extendida para la identificación bacteriana mediante el gen ARNr 16S. El ADN de las muestras extraído y purificado se inmoviliza en una superficie celular de flujo y se prepara para la secuenciación de Illumina por PCR que amplifica moléculas de ADN individuales. La secuenciación del ADN se realiza posteriormente por ciclos repetidos de extensiones de base única usando cuatro terminadores de tinte fluorescentes reversibles (uno para cada nucleótido). La fluorescencia se identifica después de la incorporación de la base mediante un escáner fluorescente de cuatro canales (Siqueira et al., 2012; Slaton et al., 2017).



Figura I.6. Secuenciador Miseq de Illumina que ha sido utilizado en la presente tesis para obtener las secuencias del gen bacteriano 16S rRNA en muestras endodónticas.

5. COMPOSICIÓN BACTERIANA DE LOS CONDUCTOS RADICULARES

La composición bacteriana del interior de los conductos radiculares presenta una alta variabilidad. La etiología de la infección endodóntica es heterogénea, hallándose múltiples combinaciones bacterianas. Es por ello que ninguna de las especies puede considerarse como el principal patógeno endodóntico, sino que son las diferentes combinaciones bacterianas las causantes de la enfermedad (Machado de Oliveira et al., 2007, Siqueira et al., 2004a; Siqueira & Rôças, 2009).

Las diferentes formas de periodontitis apical pueden estar relacionadas con la composición de la comunidad microbiana. Se ha observado que la composición bacteriana asociada a periodontitis apical sintomática en diferentes pacientes es más parecida entre sí en comparación con los pacientes con periodontitis apical asintomática. La presencia de ciertas comunidades podría estar asociada específicamente con algunas formas de periodontitis apical (Sakamoto et al., 2006; Siqueira et al., 2004a; Siqueira & Rôças, 2009).

La microflora bacteriana del conducto radicular está compuesta inicialmente por aerobios y anaerobios facultativos. A medida que avanza la enfermedad tienen lugar cambios ambientales como la disminución de la tensión de oxígeno, lo cual provocará cambios en la composición bacteriana (Neelakantan al., 2017). La infección intrarradicular primaria se caracteriza por la presencia de un grupo heterogéneo de microorganismos dominado por bacterias anaerobias (Munson et al., 2002; Siqueira & Rôças, 2004b).

Algunas especies poco abundantes pueden ser la piedra angular que mantiene el equilibrio dentro del biofilm y podrían llegar a ser dominantes en función de los cambios ambientales. Además, las especies poco abundantes en un individuo pueden ser muy abundantes en otro (Siqueira et al., 2005; Sogin et al., 2006).

Diferentes autores han llevado a cabo la secuenciación microbiana del interior de los conductos radiculares. Todos ellos coinciden en aplicar como criterios de exclusión que el paciente haya tomado antibiótico recientemente, que sufra enfermedad periodontal avanzada o que exista una comunicación directa entre el medio oral y la cámara pulpar (tabla I.1). De esta forma se intenta no alterar la composición bacteriana que existe en los conductos necróticos en condiciones normales, evitando contaminaciones de otros nichos orales.

	Antibiótico	Enfermedad periodontal (EP)	Corona/Caries	Otros
Blome et al., 2008	< 3 meses	Bolsa periodontal >4mm	-	-
Santos et al., 2011	-	Bolsa periodontal >4mm	-	-
Siqueira et al., 2011	-	EP avanzada	-	-
Hong et al., 2013	< 2 meses	EP avanzada	Destrucción coronal extensa / exposición pulpar	Diabetes Cáncer Inmunodeficiencia
Özok et al., 2012	-	EP avanzada	Exposición pulpar	-
Vengerfeldt et al., 2014	< 6 meses	Bolsa periodontal >5mm	Destrucción coronal extensa	Diabetes Inmunodeficiencia Fractura vertical u horizontal
Tzanetakis et al., 2015	< 3 meses	Bolsa periodontal >4mm	Exposición pulpar	Enfermedad sistémica Fractura
Peerson et al., 2017	-	Enfermedad periodontal	Exposición pulpar	-
Keskin et al., 2017	< 3 meses	Enfermedad periodontal	Destrucción coronal extensa	Enfermedad sistémica Embarazo o lactancia
Bouillaguet et al., 2018	< 2 meses	EP avanzada	Destrucción coronal extensa	Mal estado de salud Mala higiene oral
Íriboz et al., 2018	-	Enfermedad periodontal	-	Mal estado de salud Hinchazón o fistula Diabetes
Tawfik et al., 2018	< 3 meses	-	-	Cáncer Inmunodeficiencia
de Brito et al., 2020	< 3 meses	Enfermedad periodontal Antecedente traumático	-	Enfermedad sistémica Embarazo

Tabla I.1. Criterios de exclusión utilizados según autor para analizar muestras del interior de los conductos radiculares mediante secuenciación. EP = enfermedad periodontal.

Existen múltiples protocolos de recogida de muestra del interior de los conductos, pero la mayoría coinciden en unos procedimientos comunes como son: colocación de dique de goma y desinfección del diente (piedra pómez, NaClO 2,5%); recogida de muestra del interior de los conductos radiculares mediante limas, puntas de papel y suero; y por último, transporte de la muestra en un medio tamponado lo más rápido posible (tabla I.2).

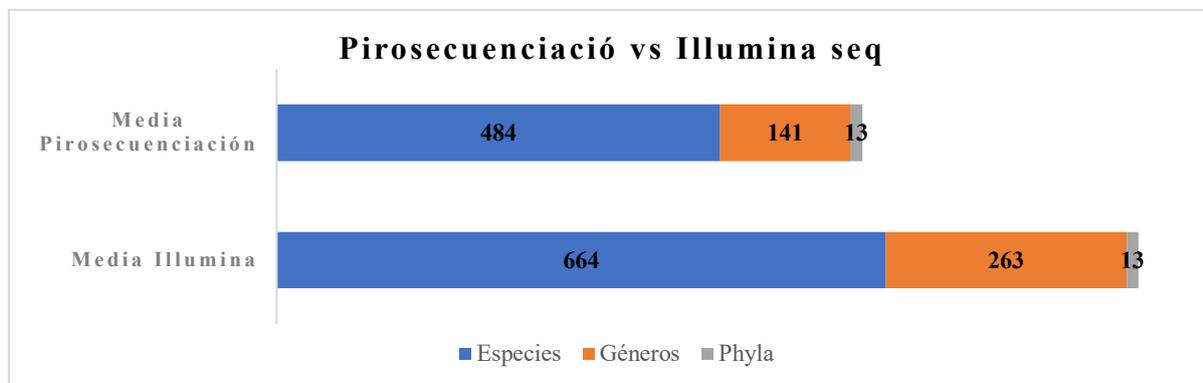
Se ha detectado en el interior de los conductos radiculares una media de 13 phyla y 574 especies correspondientes a 190 géneros por estudio (gráfica I.1). Los phyla se distribuyen en una proporción media como sigue: Firmicutes (29,7%), Bacteroidetes (25,9%), Fusobacteria (10,3%), Proteobacteria (8,6%) y Actinobacteria (8,2%) (Gráfica I.2).

Respecto a los géneros con mayor proporción en las muestras se han descrito: *Prevotella* (8,9%), *Fusobacterium* (6,3%), *Bacteroides* (5,7%), *Porphyromonas* (3,8%) y *Lactobacillus* (3,5%) (Gráfica I.3).

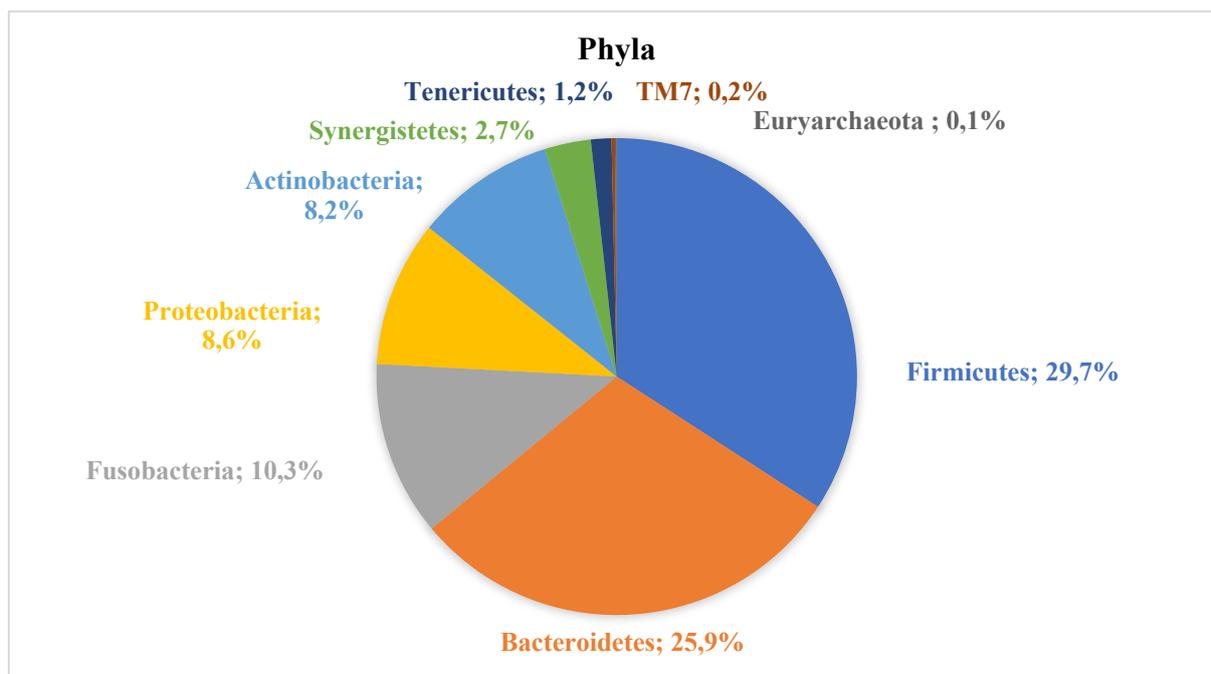
Si se analiza la prevalencia de los diferentes géneros en los estudios, se halla que *Prevotella* se halla presente en el 80% de los estudios, *Fusobacterium*, *Porphyromonas* y *Pseudoramibacter* en el 70%, mientras que *Bacteroides* y *Streptococcus* en el 60%. La gráfica I.4 ilustra estos datos.

	Blome et al., 2008	Santos et al., 2011	Hong et al., 2013	Vengerfeldt et al., 2014	Tzanetakis et al., 2015	Van der Waal et al., 2016	Íriboz et al., 2018	Tawfik et al., 2018	de Brito et al., 2020
Desinfección diente	-	-	-	Piedra pómez + PH 3%	Piedra pómez	Piedra pómez	-	Piedra pómez	Piedra pómez
Desinfección dique goma	Tintura de yodo 5% + tiosulfato de sodio	NaClO 2,5%	NaClO 2,5%	Piedra pómez + PH 3%	PH 3% + NaClO 2,5%	Etanol 80%	PH 30% + tintura de yodo 5%	NaClO 2,5%	-
Desinfección diente tras de dique goma	PH 30%	-	-	Piedra pómez + PH 3%	-	-	PH 3% + NaClO 2,5%	NaClO 2,5% + PH 30%	PH 30% + NaClO 2,5%
Desinfección cámara pulpar	-	-	-	NaClO 2,5% + tiosulfato de sodio	NaClO 5% + tiosulfato de sodio	-	-	-	-
Recogida muestra	Puntas papel	Limas + puntas papel + aspiración exudado purulento	Puntas de papel	Limas + puntas de papel	Limas + suero + puntas de papel	Limas + puntas de papel	Puntas de papel	Limas + suero + puntas de papel	Lima K #10
Medio transporte	-	Tampón TE (TRIS-EDTA)	-	Caldo Brucella	Tampón TE (TRIS-EDTA)	RTF (Fluido de transporte reducido)	-	Tampón de lisis Mo Bio	Tampón alcalino de lisis
Tiempo transcurrido hasta procesado	-	Inmediatamente	-	< 2h	-	-	-	-	-

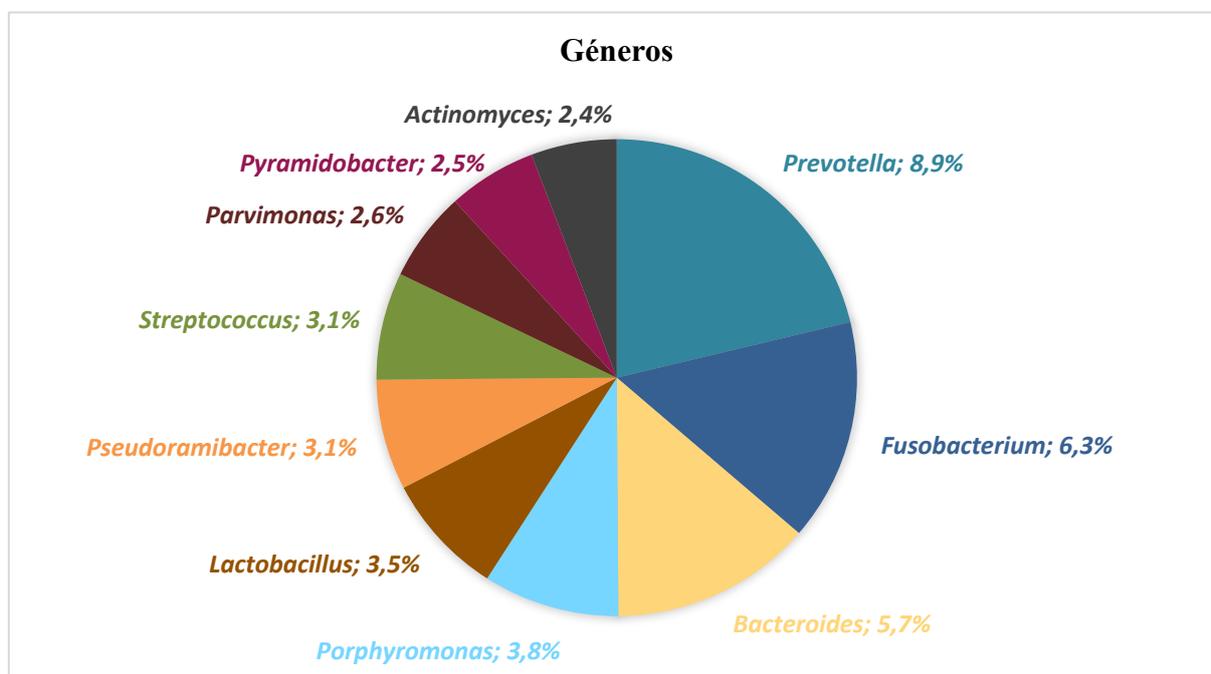
Tabla I.2. Protocolo de desinfección y recogida de muestra del interior de los conductos radiculares según autor.



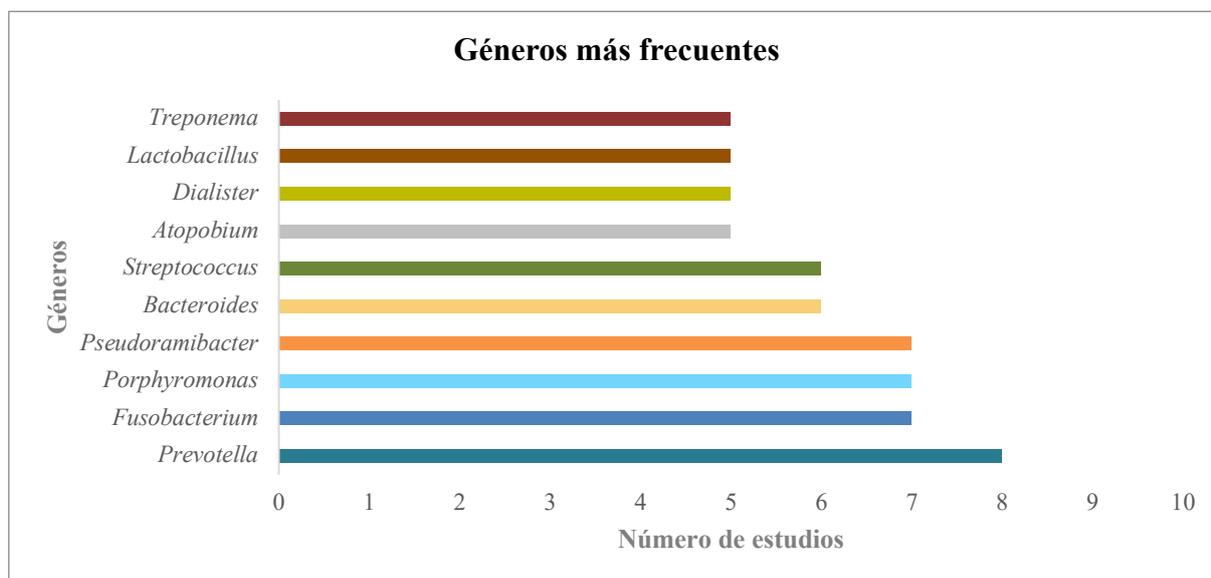
Gráfica I.1. Media del número de especies, géneros y phyla detectados mediante secuenciación Illumina y Pirosecuenciación de muestras recogidas de conductos radiculares necróticos. Datos obtenidos de los artículos, disponibles en la literatura, citados en el anexo 2.



Gráfica I.2. Proporción media de los phyla encontrados en el interior de los conductos radiculares necróticos mediante secuenciación Illumina y Pirosecuenciación. Datos recogidos de 12 artículos, disponibles en la literatura, citados en el anexo 2. La media de muestras recogidas por artículo fue de 18,5.



Gráfica I.3. Representación gráfica de la proporción media de los géneros encontrados en el interior de los conductos radiculares necróticos mediante secuenciación Illumina y Pirosecuenciación. Datos recogidos de 10 artículos, disponibles en la literatura, citados en el anexo 3. La media de muestras recogidas por artículo fue de 19,8. En esta gráfica se han incluido sólo los géneros cuya proporción media es mayor al 2%.



Gráfica I.4. Representación gráfica del número de estudios en los que se ha detectado la presencia de diferentes géneros en el interior de los conductos radiculares necróticos mediante secuenciación Illumina y Pirosecuenciación. Se muestran los 10 géneros con mayor frecuencia de aparición en los diferentes estudios. Datos recogidos de 10 artículos, disponibles en la literatura, citados en el anexo 3. La media de muestras recogidas por artículo fue de 19,8.

6. MODELOS DE ESTUDIO DE BIOFILM

El uso de modelos de estudio de biofilm tiene como objetivo principal el análisis de las interacciones microbianas y la evaluación de diferentes procedimientos de desinfección, como por ejemplo, del sistema de conductos radicular. No existe un modelo de estudio ideal, estandarizado y aceptado para el estudio de las infecciones endodónticas. Dicho modelo debería ser representativo de la realidad para que los resultados *in vitro* de las investigaciones sean extrapolables a las diferentes situaciones clínicas *in vivo*. (Kishen & Haapasalo, 2010; Swimberghe et al., 2019).

Los estudios de desinfección con microorganismos en fase planctónica son muy útiles como ensayo preliminar antes de llevar a cabo diseños de biopelículas más complejos. Sin embargo, los resultados obtenidos deben ser correctamente interpretados, ya que no representan la situación clínica real (Kishen & Haapasalo, 2010).

A la hora de valorar si un modelo de estudio de biofilm es similar a la realidad, se deben tener en cuenta los siguientes parámetros: la composición microbiana del biofilm, el sustrato sobre el que se forma la biopelícula, las condiciones de crecimiento y la posibilidad de validar y cuantificar el biofilm formado (Swimberghe et al., 2019).

El potencial adhesivo de los microorganismos al sustrato se considera un factor determinante en la infección mediada por biopelícula. Este potencial adhesivo va a depender de los microorganismos que la componen (especies, concentración del inóculo), el tipo de sustrato y las condiciones ambientales (pH, temperatura, disponibilidad de nutrientes, tiempo de incubación, entre otras) (Kishen & Haapasalo, 2010).

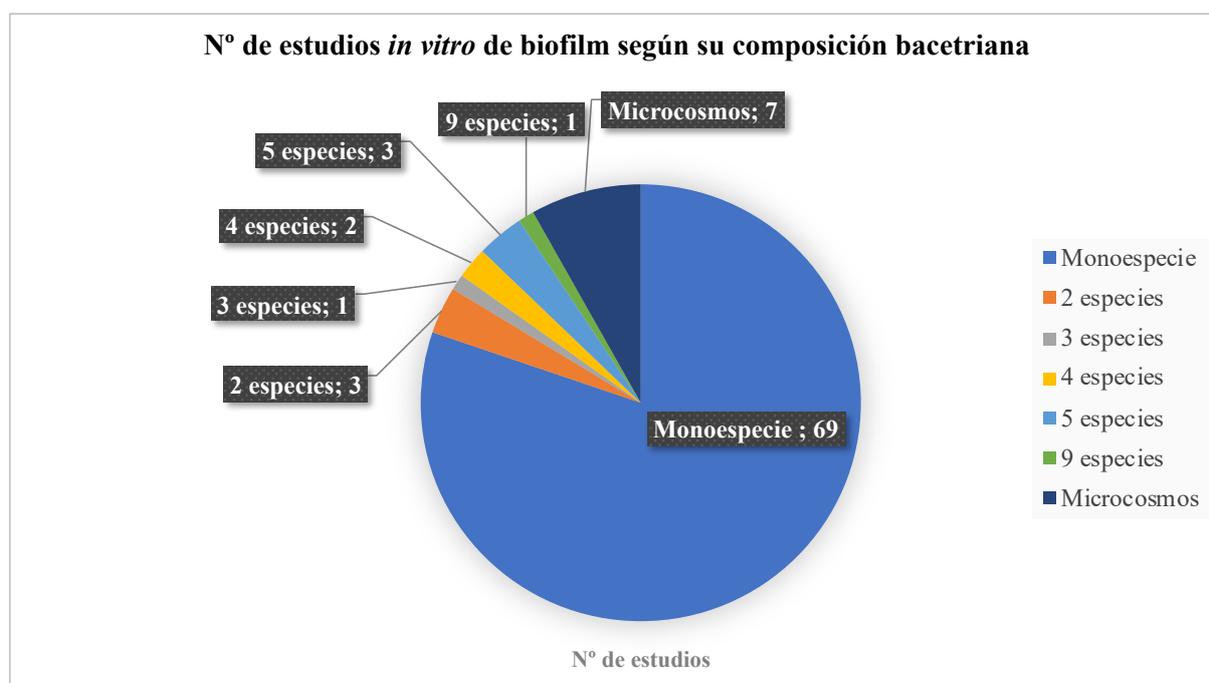
6.1. Composición microbiana del biofilm *in vitro*

Tras la revisión de la literatura hasta diciembre del 2016, Swimberghe et al. (2019) observaron que el 86% de los autores que utilizaron modelos de estudio de biofilm empleaban una sola especie, siendo la más predominante *Enterococcus faecalis*, ya que ha sido considerado el principal agente causal de las infecciones persistentes (Stuart et al., 2006). Sin embargo, actualmente esta afirmación se encuentra en entredicho, ya que otros microorganismos como *Prevotella* y *Fusobacterium* han sido aislados en mayor medida (Prada et al., 2019) (gráfica I.3 y 4). Los modelos monoespecie son muy utilizados debido a que son los más simples, fáciles de estandarizar y tienen una alta reproducibilidad (Swimberghe et al., 2019). En cambio, este tipo de modelos no son fieles a la realidad, porque en el interior de los conductos radiculares las infecciones son polimicrobianas, teniendo lugar interacciones bacterianas y cooperación metabólica que dotan a la comunidad microbiana de propiedades y funciones fisiológicas, que no pueden observarse en cada componente de forma individual, incluida la resistencia o sensibilidad a agentes antimicrobianos (Hargreaves & Cohen, 2011; Marsh, 2005).

También se utilizan modelos de estudio de biofilm en el que se asocia más de una especie conocida. A este tipo de biofilm se le denomina de ingeniería definida. En estos estudios se combinan especies modelo bien caracterizadas (Tan et al., 2017). Presentan como desventaja que esta combinación es de algún modo artificial y que el uso de diferentes especies no implica que todas ellas crezcan (Swimberghe et al., 2019). Pueden encontrarse modelos de biopelículas compuestas de 2 (van der Waal et al., 2016) a 9 especies diferentes (Bloch et al., 2017) (gráfica I.5).

Por último, en algunos estudios se utiliza un biofilm natural o microcosmos, formado por microorganismos obtenidos directamente del ambiente de interés. De esta forma se obtiene una biopelícula mucho más compleja y cercana a la realidad, pero de composición desconocida (Tan et al., 2017). Peters et al. (2011) infectaron un diente decoronado, instrumentado y esterilizado transportándolo durante una semana en la boca de un voluntario. Ordinola-Zapatra et al. (2014) infectaron muestras de dentina sujetadas mediante ortodoncia en la boca de un voluntario. Otros autores utilizan placa supra o subgingival para inocular muestras de dientes extraídos (Lin et al., 2013) o modelos de estudio hechos de material no biológico (Koopman et al., 2016; van der Waal et al., 2017; Mira et al., 2019). La composición bacteriana más similar al interior de los conductos se obtendrá al utilizar como inóculo una muestra recogida del interior de los conductos radiculares como llevaron a cabo Shaudinn et al. (2013) y van der Waal et al. (2016). Como consecuencia de la mayor diversidad y complejidad de un modelo

multiespecie, la reproducibilidad, estandarización e interpretación del experimento se verá dificultada (Mira et al., 2019; Swimberghe et al., 2019). Entre los modelos de estudio que utilizan un biofilm natural solamente Mira et al. (2019) estudiaron la dinámica de formación del biofilm, el resto de los estudios cuantificaron el tamaño del biofilm al final del ensayo. En la tabla I.3, se resumen diferentes modelos de estudio de biofilm para estudios *in vitro*.



Gráfica I.5. Representación gráfica del número de artículos publicados en la literatura en base a la composición bacteriana utilizada en el modelo de estudio *in vitro* (Actualización del gráfico publicado por Swimberghe et al., 2019)

	Autor	Origen biofilm	Sustrato	Incubación	Medio		Confirmación biofilm
					Tipo	Reemplazo	
Monoespecie	Mira et al., 2019	<i>Streptococcus mutans</i>	Placa de 96 pocillos E-plates (ACEA Biosciences)	24 horas	BHI / BHI con 0,1% sacarosa	-	MiSeq Illumina
	Sadek et al., 2019	<i>Enterococcus faecalis</i>	Dentina 4x4 mm	21 días	BHI	-	Unidades formadoras de colonia y Microscopio electrónico de barrido
Ingeniería definida	Busanello et al., 2019	<i>Streptococcus oralis</i> y <i>Actinomyces naeslundii</i>	Discos de dentina de 5 mm Ø con recubrimiento de saliva liofilizada	96 horas en fermentador de película de profundidad constante	BHI	Constante a 45 mL h ⁻¹ .	Microscopio confocal láser. Pruebas de compresión de baja carga. Tomografía de coherencia óptica.
	van der Waal et al., 2016	<i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Modelo AAA (ACTA active attachment model). Placa de 24 pocillos	48 horas Anaerobiosis	0.5 BHI con 50 mmol L ⁻¹ 1,4 tampón de ácido piperazinedi-etanosulfónico, 0.5% sacarosa y 1 mmol L ⁻¹ CaCl ₂	Cada 8 horas	Unidades formadoras de colonia
	Bloch et al., 2017	<i>Prevotella intermedia</i> , <i>Campylobacter rectus</i> , <i>Veillonella dispar</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Streptococcus oralis</i> , <i>Streptococcus anginosus</i> , <i>Actinomyces oris</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Treponema denticola</i> , <i>Tannerella forsythia</i>	Discos de hidroxiapatita de 9 mm Ø	64 horas	Medio de crecimiento (60% saliva, 10% suero fetal bovino, 30% medio fluido universal modificado)	A las 16 y 24 h	Microscopio confocal láser. Fluorescencia <i>in situ</i> . Unidades formadoras de colonia. qPCR.
Microcosmos	Koopman et al., 2015, 2016	Saliva estimulada	Modelo de biofilm MAM (multiplaque artificial mouth)	29 días	Medio mucina	Contante 60 µL min Sacarosa 10% w/v 6 min cada 2 h	qPCR / MiSeq Illumina
	van der Waal et al., 2016	Interior conductos	Modelo AAA (ACTA active attachment model). Placa de 24 pocillos	31 días	0.7% de Bacto proteosa peptona, 0.3% de peptona de tripticasa, 0.5% de extracto de levadura, 0.25% de KCl, 10 mg L ⁻¹ Vit. K, 0,05% de cisteína, 50 mmol de fosfato de potasio, 1 mmol de urea, 0,1% de arginina, 1 mmol de lisina, 1 mmol de glicina y 10% de suero fetal bovino inactivado por calor.	2 veces por semana. 1 vez en la última semana	qPCR
	van der Waal et al., 2017	Saliva	Cámara de flujo que consta de tres canales de alimentación paralelos conectados entre sí por ocho canales laterales perpendiculares	48 horas Anaerobiosis	Saliva artificial	constante 40 µL min ⁻¹	Axio Observer Z1 inverted microscope
	Luo et al., 2019	Saliva	Placa de 24 pocillo Bioflux (sistema de microfluído)	22 horas	Saliva humana filtrada al 25%		Microscopio confocal láser y software BAIT (Biofilm Architecture Inference Tool)
	Mira et al., 2019	Saliva, palaca supra y subgingival, lengua	Placa de 96 pocillos E-plates (ACEA Biosciences)	24 horas Anaerobiosis	BHI con 0,1% de sacarosa	-	MiSeq Illumina

Tabla I.3. Características de los modelos de estudio de biofilm oral *in vitro* a partir de 2016.

6.2. Sustrato del modelo de formación de biofilm *in vitro*

La mayoría de los autores utilizan dentina humana (Busanello et al., 2019; Swimberghe et al., 2019), la cual es el material más representativo de la realidad. Sin embargo, la dentina humana utilizada proviene de dientes extraídos de individuos y grupos de edad diferentes. Por lo tanto, su composición y estructura será diferente, dependiendo de aspecto como los procesos consuntivos sufridos o de la edad del sujeto de procedencia (dentina esclerótica), etc. Ozdemir et al. (2010) observaron que el *E. faecalis* formaba una biopelícula más gruesa en las muestras de dentina procedente de individuos de mayor edad, en comparación con las procedentes de individuos jóvenes. Por ello, el uso de dentina como sustrato para un modelo de formación de biofilm es probablemente más representativo de la realidad, pero difícil de estandarizar.

En cambio, otros autores se decantan por el uso de modelos de formación de biofilm con un sustrato no biológico, de manera que se consigue una mayor estandarización de las muestras. Este tipo de modelos presenta el inconveniente de que las interacciones microbianas con la superficie del modelo difieren de la realidad. Van der Waal et al. (2016) formaron biofilm a partir de muestras del interior de los conductos de dientes con periodontitis apical primaria en el modelo de estudio “AAA model” (ACTA active attachment model) desarrollado por Exterkate et al. (2010). Este modelo consta de una tapa de acero inoxidable con 24 pinzas que pueden sostener discos de 12 mm de diámetro de diferentes sustratos como cubreobjetos de vidrio o discos de hidroxiapatita (figura I.7).

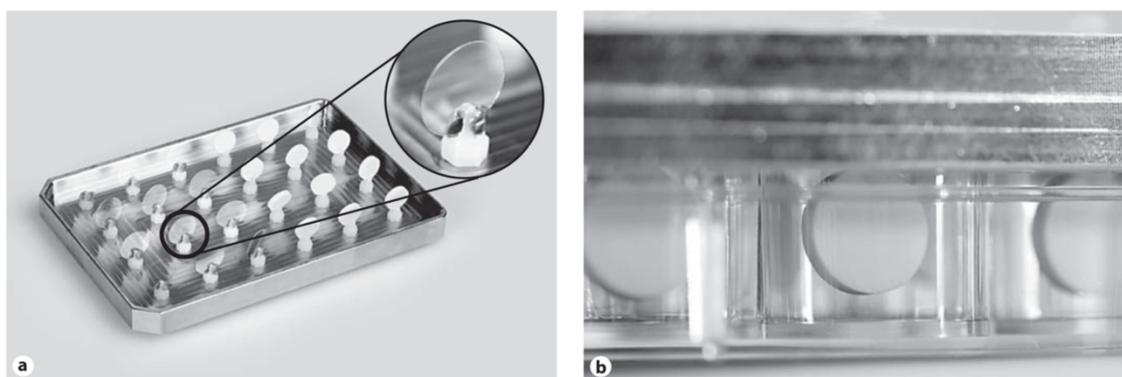


Figura I.7. Modelo de biofilm “AAA model” (ACTA active attachment model) utilizado por Van der Waal et al. (2016) y diseñado por Exterkate et al. (2010). a) Se trata de una tapa de acero inoxidable a medida con 24 abrazaderas en la que se fijan cubreobjetos de vidrio (izquierda de la imagen) o discos de hidroxiapatita (derecha de la imagen). b) Posición del modelo de estudio en el momento de crecimiento del biofilm.

Koopman et al. (2015, 2016) hicieron crecer biofilm a partir de saliva estimulada de un donante en el modelo de crecimiento de biofilm MAM (multiplaque artificial mouth) diseñado por Sissons et al. (1991). Este modelo consta de un cilindro de vidrio con cinco estaciones de crecimiento de placas. Además, permite la adición de nutrientes, así como el control de la temperatura y composición del aire (figura I.8).

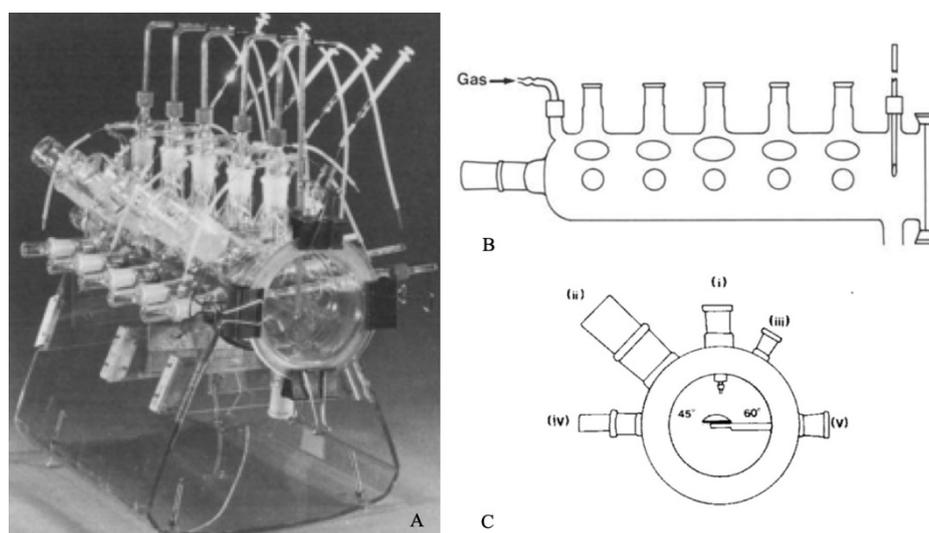


Figura I.8. Modelo de biofilm MAM (multiplaque artificial mouth) utilizado por Koopman et al. (2015, 2016) y diseñado por Sissons et al. (1991). A: vista general de la cámara de cultivo. B: vista longitudinal de la cámara de cultivo. C: vista seccional de la cámara de cultivo.

6.3. Condiciones de crecimiento

El tiempo de incubación del biofilm es uno de los parámetros de mayor variabilidad entre estudios, con un rango que va de 1 a 70 días (Koopman et al., 2015; van der Waal et al., 2016; Swimberghe et al., 2019; Mira et al., 2019). De Meyer et al. (2017) compararon el número de CFUs (colony forming units) tras la formación de un biofilm doble especie (*S. mutans* y *E. faecalis*) en un modelo de resina de conductos radiculares tras 48, 72 y 168 horas de incubación. No hubo diferencia en la cantidad de CFUs entre las 48 y 72 horas ($p > 0,05$) existiendo un menor número de CFUs a las 168h ($p < 0,05$). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Seneviratne et al. (2013), quienes observaron que el número de CFUs tras la incubación de un biofilm mono especie de *E. faecalis* era mayor a las 72 horas que a las 24 horas ($p < 0,05$) y que a partir de las 72 horas el número de CFUs decrecía, entrando en la fase de declive.

En el interior de los conductos el suministro y disponibilidad de nutrientes van a determinar la composición bacteriana. Las bacterias que componen el biofilm endodóntico pueden obtener nutrientes exógenos como carbohidratos a partir de la caries o grietas del

esmalte, así como proteínas procedentes del tejido pulpar necrótico o del exudado originado por la inflamación periapical. Debido a esto el medio de cultivo utilizado con mayor frecuencia para la formación de biofilm es el BHI (brain heart infusion). Por ser un medio rico en nutrientes que permite el crecimiento de la mayoría de las especies microbianas (Busanello et al., 2019; Swimberghe et al., 2019), sobre todo si se suplementa con ciertos nutrientes como la hemina menadiona o la vitamina K (Mira et al., 2019)

6.4. Validación del biofilm

Tras la formación de biofilm en un determinado modelo de estudio, el biofilm debe ser validado. Existen diferentes métodos de validación de biofilm, como pueden ser: recuento de colonias, técnicas moleculares o técnicas de microscopía (Swimberghe et al., 2019).

Recuento de colonias

En algunos estudios la carga bacteriana del biofilm formado es determinada mediante el recuento de CFUs (van der Waal et al., 2016; Bloch et al., 2017). Se realiza una dilución seriada que consiste en mezclar 100 μ L de suspensión bacteriana con 900 μ L de medio, esta dilución se repite hasta 10 veces. A continuación, serán cultivados 20 μ L de cada dilución en placas de agar, contabilizando las CFUs en la primera placa de agar que sea posible, por estar las colonias separadas unas de otras (Zhang et al., 2018). Se trata de una técnica ampliamente utilizada y universalmente aceptada que permite la comparación entre estudios. En cambio, presenta el inconveniente de que sólo permite la detección de microorganismos que puedan ser cultivados en el laboratorio (Kishen & Haapasalo, 2010; Swimberghe et al., 2019) (figura I.9).

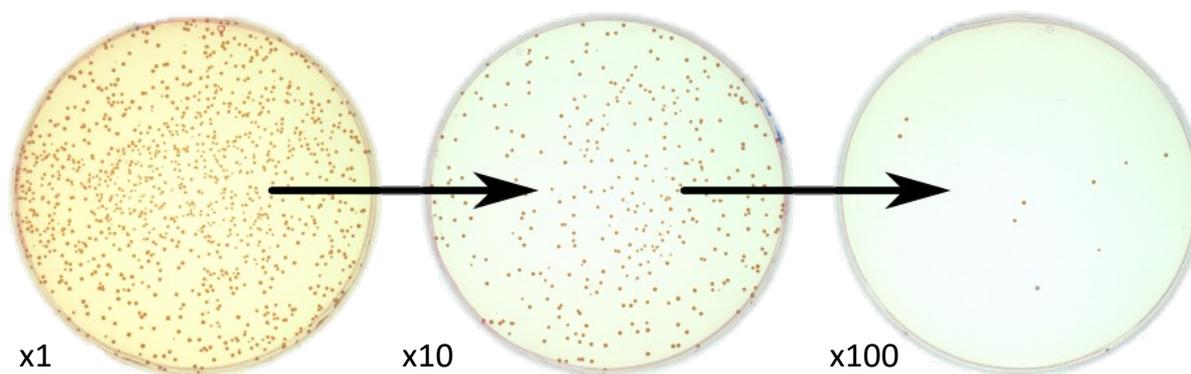


Figura I.9. Ejemplo de las placas de agar obtenidas para la contabilización de las unidades formadoras de colonias. Se observa tres diluciones seriadas: x1, x10, x 100. Se puede contabilizar CFUs en la dilución x10. Imagen obtenida de Wikiwand (2020).

Técnicas moleculares

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) es capaz de medir la amplificación de un fragmento de ADN específico mediada por cebadores, permitiendo una cuantificación precisa de la carga microbiana total (van der Waal et al., 2016; Bloch et al., 2017; Swimberghe et al., 2019). La pirosecuenciación y la secuenciación Illumina van a permitir una detección cualitativa de los microorganismos presentes en el biofilm. Las técnicas moleculares presentan la ventaja de detectar tanto las bacterias cultivables como las no cultivables por las técnicas actuales (Swimberghe et al., 2019).

Técnicas de microscopía

La visualización directa del biofilm aporta información sobre la estructura y cantidad de éste, así como sus conexiones con el sustrato. Las herramientas más utilizadas son el microscopio óptico, el electrónico de barrido y el microscopio confocal láser (Swimberghe et al., 2019).

El uso del microscopio óptico nos permite llevar a cabo una descripción general de la biopelícula e información sobre la morfología y organización de las células microbianas. Para una correcta visualización es necesario un procesamiento de la muestra que consta de: fijación, descalcificación, sección y tinción. Se ha de tener en cuenta la posibilidad de desprendimiento de la biopelícula como consecuencia de la preparación de la muestra (Ricucci & Siqueira, 2010; Swimberghe et al., 2019).

Otra técnica de visualización directa del biofilm formado es el uso del microscopio electrónico de barrido (MEB). Permite la caracterización morfológica y estructural de la

biopelícula. Requiere una preparación específica de la muestra que consta de: fijación, deshidratación, secado y recubrimiento con un revestimiento conductor. Presenta como inconveniente la posible alteración morfológica del biofilm durante la preparación de la muestra (Swimberghe et al., 2019).

Por último, también se puede utilizar el microscopio confocal láser (MCL), el cual no necesita deshidratación previa de la muestra. La muestra es sometida a una tinción fluorescente, que permite determinar la viabilidad celular y la arquitectura del biofilm. A continuación, se realiza una serie de cortes ópticos procesados mediante software. Permite el estudio de la estructura del biofilm, realizar un estudio semicuantitativo del mismo, así como determinar la viabilidad celular de la biopelícula (Bloch et al., 2017; Busanello et al., 2019; Swimberghe et al., 2019).

Swimberghe et al. (2019) tras la revisión de la literatura concluye que existe una gran variabilidad entre los diferentes modelos de estudio de biofilm. Las grandes diferencias en la selección de parámetros como el origen de las especies, el tiempo de incubación y el material del sustrato, hace difícilmente comparables los estudios. Incide en la necesidad de estandarizar un modelo de biopelícula validado que sea representativo de la realidad. Propone que se utilice una biopelícula polimicrobiana de ingeniería definida o microcosmos y dentina como sustrato. Además, hace incidencia en la necesidad de llevar a cabo un ensayo de cinética de crecimiento, para determinar la fase de maduración del biofilm en el modelo de estudio.

7. RTCA xCELLIGENCE®

El sistema de Análisis Celular en Tiempo Real (RTCA) xCELLIGENCE® es un modelo de estudio que permite la cuantificación continua de formación de biofilm mediante valores de impedancia. Este modelo está formado por una placa de microtitulación cuyos pocillos poseen microelectrodos de oro en la superficie inferior del mismo. Cuando se sumergen estos microelectrodos en una solución conductora (sustancia tamponadora o medio de crecimiento), la aplicación de un potencial eléctrico débil a través de estos electrodos hace que la corriente eléctrica fluya (figura I.10). La presencia de células adheridas en la interfaz electrodo-solución impide el paso de corriente. La magnitud de esta impedancia (similar a la resistencia eléctrica) depende del número y tamaño de las células y la calidad de la unión celular al sustrato. Cabe señalar que la salud y comportamiento de las células no se ve afectado por el potencial eléctrico (22mV aplicado de manera intermitente a una frecuencia definida por el usuario) (Ferrer et al., 2017a)

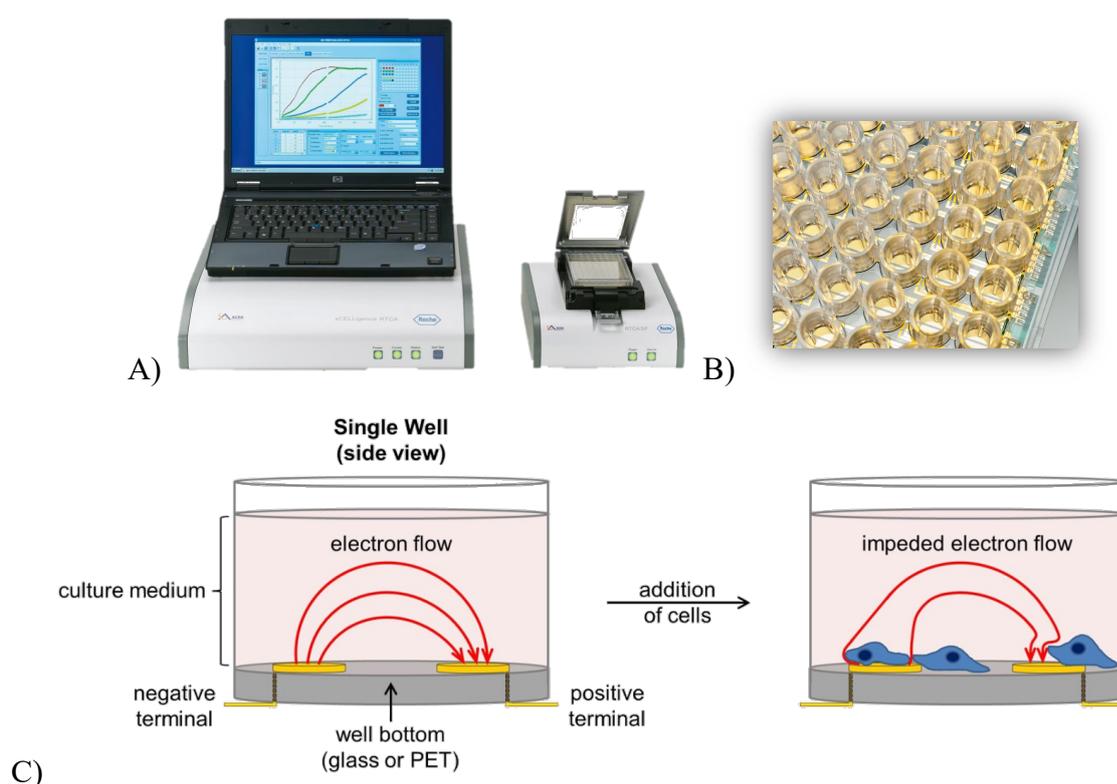


Figura I.10. A): Modelo de estudio *in vitro* RTCA xCELLIGENCE®. B) Placa de microtitulación de 96 pocillos. C) Representación gráfica del paso de corriente a través de los dos electrodos situados en el fondo de cada pocillo, con (derecha) y sin (izquierda) células adheridas.

Se ha demostrado que el sistema RTCA xCELLigence® permite el crecimiento de biofilm monoespecie de *S. mutans* y multiespecie a partir de muestras procedentes de saliva, placa supra- y subgingival y de la lengua. Se ha observado que los patrones de dinámica de formación de biofilm varían según el origen de la muestra, siendo similares para el mismo tipo de muestra de diferentes individuos. Además, la composición bacteriana tal como se determina por la secuenciación del ADN del inóculo (muestra procedente del paciente) es similar a la del biofilm resultante tras el ensayo en el sistema RTCA xCELLigence® (Mira et al., 2019). Sin embargo, todavía no se ha utilizado este sistema como modelo de biofilm endodóntico.

8. ANTIBIÓTICOS EN ENDODONCIA

Un uso correcto de los antibióticos permite resolver infecciones, prevenir y evitar la propagación de la enfermedad y minimizar las complicaciones graves a causa de la infección. Sin embargo, un uso incorrecto de los mismos conlleva una serie de riesgos y efectos secundarios como son: náuseas, vómitos, diarreas e infecciones oportunistas por hongos. El uso excesivo e indiscriminado de antibióticos está creando bacterias resistentes que no son susceptibles a ningún antibiótico (AAE, 2017).

La resistencia a los antibióticos es la tolerancia de un microorganismo frente a un antibiótico que anteriormente era efectivo (Segura-Egea et al., 2017a; Segura-Egea et al., 2017b). Las bacterias mutan en respuesta al uso de los antibióticos dejando de ser sensibles a los mismos, fenómeno que se está viendo acelerado por el uso indebido de los fármacos. La resistencia a los antibióticos es considerada una de las mayores amenazas para la salud mundial (OMS, 2018).

La mayoría de las infecciones de origen endodóntico están confinadas dentro del diente. El manejo correcto de una infección endodóntica consta del desbridamiento del conducto radicular infectado junto con el drenaje de los tejidos blandos y duros (AAE, 2017; Segura-Egea et al., 2018). Tras la necrosis de la pulpa dental no existe vascularización en el interior de los conductos radiculares, por lo que los fármacos administrados vía oral no pueden llegar al sitio de infección. Además, la presencia de material purulento limita el suministro vascular y contiene desechos celulares y proteínas que pueden unirse y secuestrar el antibiótico, disminuyendo su efecto si no se lleva a cabo un desbridamiento y drenaje adecuado (AAE, 2017).

En individuos sanos, las bacteriemias generadas por los tratamientos endodónticos no causan complicaciones y son eliminadas rápidamente sin necesidad de administrar antibióticos sistémicos (Parahitiyawa et al., 2009).

La Asociación Española de Endodoncia (AEDE), la Sociedad Europea de Endodoncia (ESE), la Asociación Dental Americana (ADA) y la Asociación Americana de Endodoncia (AAE) coinciden en la indicación del uso de antibióticos sistémicos como tratamiento coadyuvante al tratamiento de conductos en las siguientes situaciones (AAE, 2017; Segura-Egea et al., 2017a; Segura-Egea et al., 2018; Lockhart et al., 2019; Segura-Egea et al., 2020):

1. Absceso apical agudo en pacientes médicamente comprometidos (enfermedad sistémica que afecta a su sistema inmune)

2. Absceso apical agudo con afectación sistémica: hinchazones localizados fluctuantes, elevada temperatura corporal $>38^{\circ}\text{C}$, malestar general, linfadenopatías, trismus.
3. Absceso apical agudo en expansión/progresión: inicio rápido de infección severa en $<24\text{h}$, progresión del exudado purulento por el tejido intersticial y los espacios tisulares (celulitis cérvico-facial)

Además, la ESE indica el uso de antibióticos sistémicos en los siguientes casos (Segura-Egea et al., 2018):

4. Reimplante de dientes permanentes avulsionados (Andersson et al., 2017; Segura-Egea et al., 2020).
5. Tratamiento por trauma en tejidos blandos (sutura, desbridamiento) (Diangelis et al., 2017).

La AEDE y la AAE recomiendan:

6. Uso de antibióticos sistémicos de manera profiláctica en pacientes inmunocomprometidos o con condiciones predisponentes: endocarditis previa, válvulas cardíacas protésicas o reemplazo protésico reciente de articulaciones (AAE, 2017; Segura-Egea et al., 2017a; Segura-Egea et al., 2020) y en pacientes oncológicos sometidos a radioterapia o pacientes en tratamiento con bisfosfonatos por vía intravenosa (Segura-Egea et al., 2020).

Por último, la ADA indica:

7. Uso de antibióticos sistémicos en presencia de absceso apical agudo e imposibilidad de llevar a cabo un tratamiento dental conservador inmediato, debido al riesgo de compromiso sistémico (Lockhart et al., 2019).
8. Prescripción de antibiótico sistémico cuando no se puede llevar a cabo el tratamiento dental conservador inmediato y el paciente presenta necrosis con periodontitis apical sintomática. El paciente debe hacer uso del antibiótico en caso de empeoramiento de los síntomas por riesgo de compromiso sistémico (Lockhart et al., 2019).

Por lo tanto, en todas las situaciones clínicas no incluidas anteriormente estará contraindicado el uso de antibióticos sistémicos (AAE, 2017; Segura-Egea et al., 2017a; Segura-Egea et al., 2018; Lockhart et al., 2019; Segura-Egea et al., 2020), no habiendo evidencia de beneficios terapéuticos derivados de su uso (Walton & Chiappinelli, 1993; Fouad et al., 1996).

En la actualidad existe un gran número de profesionales que llevan a cabo un uso indebido de los antibióticos:

1. En el caso de la pulpitis irreversible con o sin periodontitis apical sintomática, un alto porcentaje de dentistas generales (9,4-48%) y en menor medida de endodoncistas (1,1-28,6%) utilizan los antibióticos como tratamiento coadyuvante (tabla I.4). En una revisión sistemática Cochrane, no se ha encontrado evidencia de que el uso de antibióticos alivie el dolor en una pulpitis irreversible (Agnihotry et al., 2016)
2. Ante los casos de necrosis el uso de antibióticos es similar entre dentistas generales y endodoncistas (8,1-52,9%) aumentando su uso en caso de presencia de trayecto fistuloso (28,1-94,3) (tabla I.4).
3. Tampoco estaría indicada la prescripción de antibióticos si el paciente presenta un absceso agudo con hinchazón localizado y fluctuante en la región periapical del diente, sin enfermedades sistémicas que afecten a su sistema autoinmune y sin malestar general. En este caso, la mayoría de dentistas generales y endodoncistas utilizarían antibiótico (71,5-95,9%) (Segura-Egea et al., 2017a) (tabla I.4).

Prescriptor	Autor	País	n	PULPITIS			NECROSIS					
				Reversible	Irreversible	Irreversible	Periodontitis apical					
						Sintomática	Asintomática	Asintomática	Sintomática	Sintomática		Hinchazón (Afectación sistémica)
					Fístula		Fístula	Absceso agudo				
Estudiante último curso pregrado	Martin-Jiménez et al., 2018	España	116		29,3	62,8	0,2	38,4	43,9			90,2
	Alonso-Ezpeleta et al., 2018	España	67		11,9	22,4	7,5	25,4	37,3			95,5
MEDIA					20,6	42,6	3,825	31,9	40,6			92,85
Estudiante posgrado endodencia	Alattas & Alyami, 2017	Arabia Saudi	195		17,5	31,3	8,1	28,1	20,6		81,9	
	Al Masan et al., 2018	UK	32	3,1	9,4		18,8		28,1		78,1	
	Maslamani & Sedeqi, 2018	Kuwait	227	12,3	18,1	45,8	26,4	49,8	53,7		88,1	
	Agnihotry et al., 2019	EEUU			39,3							
	Vasudavan et al., 2019	EEUU	396		48			60,0				99,0
	MEDIA				7,7	26,5	38,5	17,8	46,0	34,2		82,7
Dentista general	Rodríguez-Núñez et al., 2009	España (AEDE)	158		11,4	28,6	14,3	21,4	52,9	94,3		
	Germaek et al., 2017	EEUU (AAE)	686		1,75	6,4		10,5	43,6	29,7	95,9	
	Bolfoni et al., 2018	Brasil	615		1,1	6,2		20,5	11,5		71,5	88,1
	Vasudavan et al., 2019	EEUU	33,6		3,0			20,0				100,0
	MEDIA					4,3	13,7	14,3	18,1	36,0	62,0	83,7
Endodocista												

Tabla I.4. Frecuencia (en porcentaje de administración antibiótica frente a las diferentes situaciones clínicas).

Segura-Egea et al. (2017b) indicaron que existe tendencia a la sobreprescripción de antibiótico el tratamiento de infecciones endodónticas, por lo que es necesario mejorar los hábitos de prescripción mediante iniciativas educativas para llevar a cabo un uso correcto y coherente de los mismos.

Tras una revisión sistemática y meta-análisis de la literatura Tampi et al. (2019) observaron que el uso de antibiótico como coadyuvante en el tratamiento conservador se encuentra asociado a diarrea y a un riesgo bajo de reagudización de la infección endodóntica. También, se encuentra asociado a un alto riesgo de que el paciente experimente malestar. Además, se observa un alto riesgo de daños adicionales tras el uso de antibióticos como:

infección por *Clostridium difficile*, infecciones resistentes y aumento de la mortalidad y hospitalización. Por último, concluye que el uso de antibiótico solo o como complemento del tratamiento conservador, sugiere un beneficio y un daño en cuanto al dolor e hinchazón intraoral.

El antibiótico de primera elección en endodoncia es la penicilina y sus derivados: En EE. UU. se utilizan principalmente la penicilina V y la amoxicilina, mientras que en Europa se utilizan la amoxicilina y su combinación con ácido clavulánico. En caso de alergia o de resultado insatisfactorio los antibióticos más utilizados son: la clindamicina, el metronidazol y la azitromicina (tabla I.5).

Tradicionalmente se ha explicado que el tratamiento antibiótico debe mantenerse al menos 7-10 días, aunque los síntomas hayan remitido para evitar la aparición de resistencias bacterianas. Sin embargo, no existe evidencia científica que apoye que el uso de antibióticos durante un periodo corto favorezca la aparición de cepas resistentes (Llewelyn et al., 2017; Martín-González & Segura-Egea, 2018). Además, se ha demostrado que las terapias de 7 días con amoxicilina aumentan la población de cepas resistentes (Lacey et al., 1983; AAE, 2017).

La mayoría de los clínicos indican una terapia antibiótica de entre 5 a 7 días de duración (tabla I.5), siendo habitualmente de 3 a 7 días suficientes para controlar la infección. Actualmente, se recomienda revisar a los pacientes tras 2-3 días de iniciar la antibioterapia para determinar si el tratamiento debe suspenderse o continuarse. Tan pronto como los síntomas y signos se hayan resuelto, la terapia con antibióticos debe suspenderse (AAE, 1999; Spellberg, 2016).

Prescriptor	Autor	País	n	Antibiótico 1ª elección	Antibiótico 2ª elección/ Alergia	Duración
Estudiante último curso	Martin- Jiménez et al., 2018	España	116	Amoxi.-clav. 875/125mg 41%	Clindamicina 300 mg 99%	7±2 días
				Amoxicilina 750mg 30%	Azitromicina 500mg 1%	
Estudiante postgrado endodoncia	Alonso- Ezpeleta et al., 2018	España	67	Amoxi.-clav. 875/125 mg 49,3%	Clindamicina 300mg 71,6%	6,8±1,2 días
				Amoxicilina 500mg 17,9%	Azitromicina 500mg 28,4%	
Dentista general	Palmer et al., 2000	Reino Unido	929	Amoxicilina 250mg	Penicilina VK 250mg Metronidazol 200/250/400 mg	5±2 días
	Kandemir & Ergül, 2000	Turquía	-	Ampicilina	Penicilina VK	-
	Dailey & Martin, 2001	Reino Unido	-	Amoxicilina	Amoxicilina + Metronidazol	-
	Tulip & Palmer, 2008	Reino Unido	-	Amoxicilina	Metronidazol	-
	Mainjot et al., 2009	Bélgica	268	Amoxicilina	Clindamicina Macrólidos (Azitromicina, Claritromicina, Eritromicina)	-
	Skučaitė et al., 2010	Lituania	956	Amoxicilina	Penicilina VK	-
	Alattas & Alyami, 2017	Arabia Saudi	195	Amoxicilina 49,4% Amoxi.-clav. 39,1%	Clindamicina 54,97% Eritromicina 19,21% Metronidazol + espiramicina 16,56% Azitromicina 8,61%	5 días 67,5%; 7 días 24,5%
	Maslamani & Sedeqi, 2018	Kuwait	227	Amoxicilina 500mg	Metronidazol 250mg	-
	Vasudavan et al., 2019	EEUU	396	Penicilina (Penicilina/Amoxicilina)	Clindamicina	-
	Kaptan et al., 2013	Turquía	589	Amoxi.-clav. 61,8%	Amoxicilina 46,5% Clindamicina 26,8% Metronidazol 19,7%	-
Cirujano oral	Segura-Egea et al., 2010	España	127	Amoxi.-clav. 875/125mg 42% Amoxicilina 750mg 18% Amoxicilina 500mg 9%	Clindamicina 300mg (65%) Azitromicina (15%) Metronidazol (13%)	7±1 días
	Peric et al., 2015	Croacia	110	Amoxi.-clav. 46,6%	Clindamicina 17,7% Metronidazol 16,6% Amoxicilina 13,5% Azitromicina 1%	7 días
Endodoncista	Rodríguez- Núñez et al., 2009	España (AEDE)	158	Amoxi.-clav. 875/125mg 26,6% Amoxicilina 500mg 20,3% Amoxicilina 750mg 15,2% Amoxi.-clav. 500/125mg 15,2%	Clindamicina 300mg 63,2% Metronidazol espiramicina 125 mg	6,8±1,8 días
	Germack et al., 2017	EEUU (AAE)	686	Amoxicilina 500mg 60,7% Penicilina V 500mg 30,4%	Clindamicina 95,43% Azitromicina 2,95%	7 días
	Bolfoni et al., 2018	Brasil	615	Amoxicilina 83,1% Metronidazol 45,5% Amoxi.-clav. 30,9%	Clindamicina (33%); Azitromicina (29,2%)	7 días 67,9% 5 días 15,3%
	Vasudavan et al., 2019	EEUU	34	Penicilina (Penicilina>amoxicilina)	Clindamicina	

Tabla I.5. Estudios sobre prescripción antibiótica por odontólogos (ampliación tabla Segura-Egea et al., 2017a)

La penicilina VK y amoxicilina son antibióticos betalactámicos, cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir las enzimas (peptidasas y carboxipeptidasas) (Vademecum, 2018) (conocidas como proteínas de unión a las penicilinas, PBs) involucradas en la síntesis del peptidoglicano bacteriano (componente estructural de la pared celular bacteriana) produciendo posteriormente la lisis y muerte celular (AEMPS, 2017a). Tienen actividad bactericida, buena distribución y baja toxicidad (Wright, 1999).

La amoxicilina representa una mejora sintética sobre la molécula de penicilina original. La amoxicilina presenta una mejor absorción, se puede tomar con alimentos y es resistente al ácido estomacal. Además, tiene un espectro más amplio de efectividad y una vida media mayor, que permite que se tomen dosis 3 veces al día, en lugar de 4 veces al día como ocurre con la penicilina (Barr et al., 1994; AAE, 2017; Segura-Egea et al., 2017a; Segura-Egea et al., 2018).

Según la AEMPS la amoxicilina está indicada en abscesos dentales con celulitis diseminada en dosis de 250-500 mg cada 8 horas y de 750-1000 mg cada 8 horas en casos de infecciones graves (AEMPS, 2017a). La pauta de administración más frecuente descrita en la bibliografía es de 500-750 mg cada 8 horas (tabla I.5). También puede ser administrada una dosis de carga de 1000mg seguida de 500 mg cada 8 horas (Segura-Egea et al., 2017a).

La AAE recomienda el uso de amoxicilina 500 mg como antibiótico de primera elección en una dosis de 3 veces al día durante 3 a 7 días (AAE, 2017)

Los principales mecanismos de resistencia a la amoxicilina son: la inactivación por las beta-lactamasas bacterianas, o la alteración de las proteínas de unión a la penicilina (PBPs) que reducen la afinidad de la amoxicilina por la diana. Además, la impermeabilidad de la bacteria o los mecanismos de bombas de expulsión pueden causar o contribuir a la resistencia bacteriana, especialmente en bacterias Gram-negativas (Nikaido, 1998; AAE, 2017; AEMPS, 2017a).

La amoxicilina es sensible a la degradación por las beta-lactamasas producidas por bacterias resistentes y por tanto el espectro de actividad de la amoxicilina sola no incluye microorganismos productores de estas enzimas. El ácido clavulánico inactiva las enzimas beta-lactamasas, por ello se puede combinar amoxicilina con ácido clavulánico en aquellos pacientes con abscesos dentales graves, con celulitis diseminada en los que la amoxicilina, junto al correcto desbridamiento y drenaje, no esté produciendo una mejoría de los síntomas del paciente (AAE, 2017; AEMPS, 2017a). La dosis recomendada por la AEMPS es de 500/125 mg 3 veces al día o 875/125 mg 2 o 3 veces al día (AEMPS, 2017b, 2017c), mientras que la dosis más frecuentemente utilizada descrita en la bibliografía es de 875/125 mg 3 veces al día

(tabla I.5). La ADA (American Dental Association) recomienda el uso de amoxicilina con ácido clavulánico 500/125mg, en caso de que el uso de amoxicilina 500mg no esté produciendo una mejoría de los síntomas del paciente, con una pauta de dosificación de 3 veces al día durante 7 días (Lockhart et al., 2019). La asociación amoxicilina con ácido clavulánico se ha relacionado con una mayor incidencia de reacciones adversas graves, como la infección por *Clostridium difficile*, hepatotoxicidad, síndrome de Stevens-Johnson o púrpura, por lo que se recomienda reservar para pacientes inmunocomprometidos y pacientes que no respondan a la amoxicilina sola tras el correcto tratamiento quirúrgico (Salvo et al., 2007; Segura-Egea et al., 2017a).

La clindamicina es un antibiótico que pertenece al grupo de las lincosamidas, Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de las primeras etapas de la síntesis proteica mediante la unión a la subunidad 50S del ribosoma de la bacteria (Reusser, 1975). A dosis normales es fundamentalmente bacteriostática frente a bacterias anaerobias Gram-positivas y frente a un gran número de bacterias anaerobias, aunque a concentraciones elevadas puede tener un efecto bactericida. La dosis recomendada por la AEMPS es de 600 a 1.800 mg al día divididos en de 2 a 4 dosis iguales en función de la gravedad, del lugar de la infección y de la sensibilidad del microorganismo (AEMPS, 2019). También puede ser administrada mediante una dosis de carga de 600 mg seguida de 300 mg cada 6 horas (Segura-Egea et al., 2017a) o sin dosis de carga (Lockhart et al., 2019). La ADA recomienda su uso en pacientes alérgicos a penicilina (Lockhart et al., 2019).

El metronidazol es un nitroimidazol indicado para el tratamiento de infecciones graves provocadas por bacterias anaerobias. El metronidazol es reducido por el metabolismo bacteriano generando una serie de radicales libres que interaccionan con el ADN celular, produciendo una pérdida de la estructura helicoidal, rotura de la cadena y posteriormente la inhibición resultante de la síntesis de ácidos nucleicos y muerte celular (AEMPS, 2016). Si tras 2 o 3 días de uso la amoxicilina no es efectiva, se recomienda el uso de metronidazol como medicamento suplementario (Khemaleelakul et al., 2002; Rodríguez-Núñez et al., 2009; Lockhart et al., 2019). Puede ser administrado mediante una dosis de carga de 1000 mg seguido de 500 mg cada 6 horas (Segura-Egea et al., 2017a) o 500 mg cada 8 horas (Lockhart et al., 2019). Debido a que no es eficaz frente a bacterias aeróbicas y facultativas (Khemaleelakul et al., 2002; Baumgartner & Xia, 2003) es frecuente su combinación con espiramicina para tratar abscesos odontogénicos. La espiramicina es un macrólido que actúa a nivel del ribosoma bacteriano impidiendo la lectura de ARN mensajero. La combinación de ambos antibióticos es potencialmente sinérgica, necesitando hasta 30 veces menos de metronidazol y 10 veces menos

de espiramicina que cuando se administran por separado. La dosis recomendada es de 3 - 4,5 Millones de UI de espiramicina y 500 - 750 mg de metronidazol divididas en 2 o 3 tomas al día (AEMPS 2017d; Roche & Yoshimori, 1997; Rodriguez-Núñez et al., 2009).

La azitromicina es un macrólido efectivo frente bacterias aerobias y anaerobias Gram-positivas y Gram-negativas (Moore, 1999), cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas, por unión a la subunidad 50S ribosómica y por tanto, la inhibición de la translocación de péptidos. La posología consiste en 500 mg al día durante 3 días, aunque también puede administrarse mediante una dosis de carga de 500 mg seguida de 250 mg al día durante 4 días (Segura-Egea et al., 2017a; AEMPS 2018, Lockhart et al., 2019). La ADA recomienda su uso en pacientes alérgicos a penicilina (Lockhart et al., 2019).

El antibiótico de elección en el caso de reimplante de dientes permanentes avulsionados es la tetraciclina, pudiendo utilizar también amoxicilina o penicilina V en menores de 12 años para evitar la discoloración dental. Además, está indicado la aplicación tópica de tetraciclinas (minociclina o doxiciclina 1mg por cada 20 mL de solución salina durante 5 minutos) sobre la raíz de dientes permanentes inmaduros avulsionados (Andersson et al., 2017).

La prescripción antibiótica se realiza habitualmente de forma empírica. Ocasionalmente, a pesar del desbridamiento local adecuado y la cobertura antibiótica, el tratamiento es ineficaz y el estado del paciente empeora. El paciente puede presentar microorganismos virulentos o resistentes al antibiótico prescrito. En estos casos, las pruebas de sensibilidad pueden ayudar al profesional a seleccionar el antibiótico óptimo (AAE, 2017).

8.1. Estudios de sensibilidad frente a antimicrobianos

Las pruebas de sensibilidad antimicrobianas son una herramienta *in vitro* para ayudar a los clínicos a controlar los procesos infecciosos desarrollados en los pacientes. Mediante estos ensayos se puede realizar una predicción *in vitro* de la respuesta de los microorganismos causantes de enfermedad frente a un determinado antibiótico (Herrera, 1999). Las pruebas de sensibilidad más extendidas son: la prueba de difusión en agar, la técnica Epsilon test (Etest) y las pruebas de microdilución (figura I.11).

En la técnica de difusión en agar se lleva el inóculo bacteriano a una concentración (turbidez) igual a la del estándar 0,5 de McFarlane. Posteriormente se siembra en una placa agar para conseguir un “tapiz” uniforme y se colocan los discos que contienen el antibiótico en la periferia de la placa a una distancia equidistante entre sí. Tras una incubación de 18-24 horas se mide el halo de inhibición de cada disco interpretando, en función de las tablas adecuadas

para cada microorganismo, si el microorganismo es sensible, intermedio o resistente a ese antibiótico (Herrera, 1999; Prats, 2006; Spicer, 2009; Lang et al., 2016).

Llevando a cabo el mismo procedimiento, en lugar de utilizar discos con antibiótico se puede colocar la tira Etest. Esta tira contiene una concentración decreciente de un determinado antibiótico. Tras una incubación de 18 horas se observará una inhibición elipsoidal y simétrica, el punto en que el extremo de la zona de inhibición intersecciona con la tira es el valor de la CIM (concentración mínima inhibitoria) (Herrera, 1999; Khemaleelakul et al., 2002; Baumgartner et al., 2003; Prats, 2006; Spicer, 2009).

Para llevar a cabo la prueba de microdilución se prepara el inóculo de la misma forma mencionada anteriormente. En este caso se coloca 100µL de inóculo en los pocillos deseados en una placa de 96 pocillos. Cada pocillo contiene antibiótico a diferentes concentraciones. Tras 18 horas de incubación la CMI será la concentración del último pocillo donde no hay crecimiento (Herrera, 1999; Prats, 2006; Spicer, 2009). El grado de crecimiento puede ser cuantificado mediante un espectrofotómetro midiendo el grado de turbidez, que provocan las bacterias en forma planctónica, siendo directamente proporcional al crecimiento bacteriano (Brescó-Salinas et al., 2006; Slaton et al., 2017).

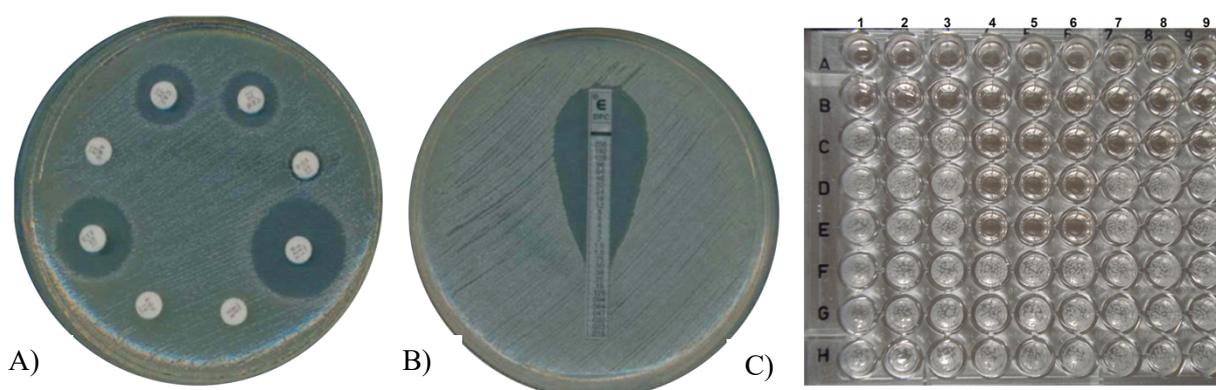


Figura I.11. Representación gráfica de diferentes tipos de antibiograma. A) técnica de difusión en placa de agar, en la que se observa diferentes halos de inhibición alrededor de los discos con diferentes antibióticos y concentraciones. B) antibiograma por Etest en el que se observa una elipse de inhibición (Cercenado & Saavedra-Lozano, 2009). C) test de microdilución en el que se compara la acción antifúngica de tres péptidos diferentes (péptido n° 1 en las columnas 1-3, péptido n° 2 en las columnas 4-6, péptido n° 3 en las columnas 7-9) a diferentes concentraciones (disminución progresiva de la concentración desde la fila A hasta la fila H) (de-Souza-Silva et al., 2018).

En la literatura es frecuente el uso de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana mencionadas anteriormente. Khemaleelakul et al. (2002) y Baumgartner & Xia, (2003) determinaron la susceptibilidad antibiótica de bacterias aisladas procedentes de la aspiración de abscesos endodónticos mediante la prueba Etest. De esta forma obtuvieron la MIC de la penicilina V, amoxicilina, amoxicilina y ácido clavulánico, clindamicina, metronidazol y claritromicina de las especies aisladas.

Bresco et al. (2006) y Slaton et al. (2017) determinaron la susceptibilidad antibiótica mediante pruebas de turbidez. Para llevar a cabo la prueba de sensibilidad Bresco et al. (2006) aislaron las bacterias obtenidas de pericoronaritis de terceros molares y lesiones periapicales mientras que, Slaton et al. (2017) llevaron a cabo el estudio aplicando a todas las bacterias en conjunto, obtenidas de abscesos endodónticos, los diferentes antibióticos.

Estas pruebas de sensibilidad antimicrobiana tienen la ventaja de ser fácilmente estandarizables. En cambio, no son representativas de la realidad debido a que las bacterias en el interior de los conductos se encuentran agrupadas formando biofilm y este tipo de pruebas *in vitro* no permiten el desarrollo de una biopelícula. Además, se debe utilizar la concentración antibiótica que llegue al interior de los conductos tras una dosificación por vía oral, pudiendo tomar como referencia la concentración antibiótica en plasma.

JUSTIFICACIÓN DE LA PRESENTE TESIS

Es de vital importancia conocer la etiología y patogénesis de una enfermedad para desarrollar las formas más efectivas de prevención y tratamiento. Por ello, conocer y comprender la microbiología endodóntica, específicamente la biología de las biopelículas, que se forman en el interior de los conductos radiculares, es esencial para comprender el potencial patogénico de la microbiota del conducto radicular y el desarrollo de tratamientos efectivos y eficientes (Siqueira y Rôças, 2009; Jhajharia et al., 2015; Neelakantan, 2018).

Además, tal como se ha descrito en esta introducción, una mejora de los métodos para evaluar la susceptibilidad a los antibióticos es fundamental para lograr una mayor efectividad, individualizar los tratamientos y disminuir la formación de cepas resistentes (Mira et al., 2019). En este sentido, la tendencia actual en odontología es hacia la individualización de las estrategias diagnósticas, preventivas y terapéuticas (Bartold, 2017). Por ello, la presente tesis pretende desarrollar y testar un sistema de cuantificación del biofilm endodóntico que suponga un modelo representativo de este tipo de infecciones y que permita la evaluación de la susceptibilidad a los distintos tratamientos antibióticos, con la intención de mejorar los actualmente disponibles. Para ello hemos utilizado un modelo de microcosmos que nos permita testar la susceptibilidad antibiótica del biofilm de forma rápida y fiable, además de poder evaluar y cuantificar la dinámica de crecimiento de la biopelícula. Además, a la hora de determinar la composición bacteriana de las muestras, hemos optado por técnicas de secuenciación masiva del ADN que permitan la detección de todos los integrantes de las biopelículas.

OBJETIVOS

1. Desarrollar y testar el sistema RTCA xCelligence® de medida de impedancia como modelo *in vitro* para medir el crecimiento de biofilms endodónticos a partir de muestras del interior de los conductos radiculares y analizar en tiempo real la dinámica de formación de biofilm de origen endodóntico.
2. Determinar la composición bacteriana del interior de los conductos radiculares en pacientes con necrosis pulpar que no habían tomado tratamiento antibiótico en el último mes previo a la toma de la muestra.
3. Identificar la composición bacteriana del interior de los conductos radiculares en pacientes con necrosis pulpar que habían tomado tratamiento antibiótico en el último mes previo a la toma de la muestra.
4. Evaluar *in vitro* el efecto de amoxicilina - ác. clavulánico, metronidazol y azitromicina sobre la dinámica de formación de biofilm y su composición en dientes necróticos de pacientes que no habían tomado tratamiento antibiótico en el último mes previo a la toma de la muestra.
5. Relacionar parámetros clínicos con la respuesta de crecimiento microbiano a los antibióticos testados.

METODOLOGÍA

1. SELECCIÓN DEL DONANTE

Tras la aprobación por parte del Comité Ético de Investigación en Humanos, con el número de registro H1484736767061 (anexo 1) se procedió a la recogida de muestra del interior de los conductos. Los pacientes incluidos en el estudio acudieron a la Clínica Odontológica de la Fundació Lluís Alcanyís de la Universitat de València y fueron derivados al Postgrado en Endodoncia.

Los criterios de inclusión fueron:

- Mayores de 18 años.
- Presentar uno o más dientes que respondieran de forma negativa a los test de sensibilidad mediante frío (la vitalidad negativa fue confirmada mediante ausencia de sangrado tras la realización de la apertura).
- No haber tomado antibiótico en el último mes.
- Sondaje periodontal ≤ 4 mm.
- Ausencia de fractura corono-radicular.
- Que no existiera comunicación entre el medio bucal y la cámara pulpar.

De forma secundaria, se tomó muestra del interior de los conductos radiculares de pacientes que cumplían todos los criterios de inclusión mencionados, excepto que sí habían recibido tratamiento antibiótico en el último mes.

En la figura M.1, se ilustra una imagen clínica y radiográfica de un paciente tipo, aunque la presencia de área periapical no constituía un criterio de inclusión.



Figura M.1. Imágenes representativas de la selección del donante: A) Paciente que en el 1.2 responde de forma negativa a los test de sensibilidad al frío, no existe comunicación entre el medio bucal y la cámara pulpar, la profundidad del surco gingival es ≤ 4 mm y no se observa fractura corono-radicular. Además, no ha sido tratado con antibiótico en el último mes. B) Paciente que presenta área radiolúcida apical en el 1.2.

Los datos clínicos que se recopilieron fueron:

- Edad y sexo del paciente.
- Enfermedades o antecedentes de interés.
- Número de diente.
- Antecedente de traumatismo.
- Presencia de caries y obturación filtrada.
- Respuesta a la percusión y palpación.
- Movilidad y sondaje del diente.
- Dolor.
- Área radiolúcida.
- Prueba de vitalidad mediante test de sensibilidad al frío.
- Sangrado o supuración tras la apertura.

2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

La recogida de muestra se llevó a cabo con dique de goma. Se desinfectó el diente con clorhexidina al 2% y se comenzó la apertura con fresa de diamante estéril. Se utilizó otra fresa estéril para entrar en la cámara pulpar con irrigación con suero salino estéril. La recogida de muestra del interior de los conductos se llevó a cabo mediante limas k del 08, 10 y 15 junto con 6 puntas de papel y suero salino estéril. Las limas y puntas de papel fueron colocadas en un tubo Eppendorf con PBS (tampón fosfato salino). Las muestras fueron transportadas al laboratorio en frío (4-10°C) (figura M.2).

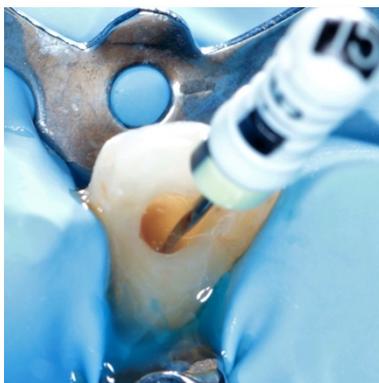


Figura M.2. Fotografía representativa del proceso de toma de muestra, con aislamiento con dique de goma, llevada a cabo mediante limas k del 08, 10 y 15 junto con puntas de papel y suero salino estéril.

3. PREPARACIÓN DEL MEDIO

Se prepararon diferentes medios de cultivo para el presente ensayo. El medio de cultivo (Med) estuvo compuesto de BHI (Brain Heart Infusion) suplementado con hemina menadiona (HM) a una concentración de 5µL/mL y con vitamina K (VitK) a una concentración de 10µL/mL (Llena et al., 2019). Además, se prepararon diferentes medios con antibiótico añadiendo al medio (Med) amoxicilina – ác. clavulánico (MedA) a una concentración de 8µg/mL, metronidazol (MedMtr) a una concentración de 16µg/mL o azitromicina (MedAztr) a una concentración de 0,4 µg/mL. La concentración de antibiótico fue determinada en función de la concentración sérica máxima alcanzada para cada uno de ellos en caso de ingerir por vía oral 875/125 mg de amoxicilina – ác. clavulánico, 500 mg de metronidazol y 500 mg de azitromicina (Zhang et al., 2013; AEMPS, 2019b; Vademecum, 2006).

4. PROCESADO DE LA MUESTRA

Entre la obtención de la muestra y el procesado de ésta transcurrieron menos de 3 horas. La muestra fue mezclada en vortex durante 20 segundos y centrifugada durante 2 minutos a 6000 rpm. A continuación, se eliminaron las puntas de papel, las limas y el sobrenadante. El pellet obtenido fue resuspendido en 820 μL de Med obteniendo la suspensión celular (figura M.3).

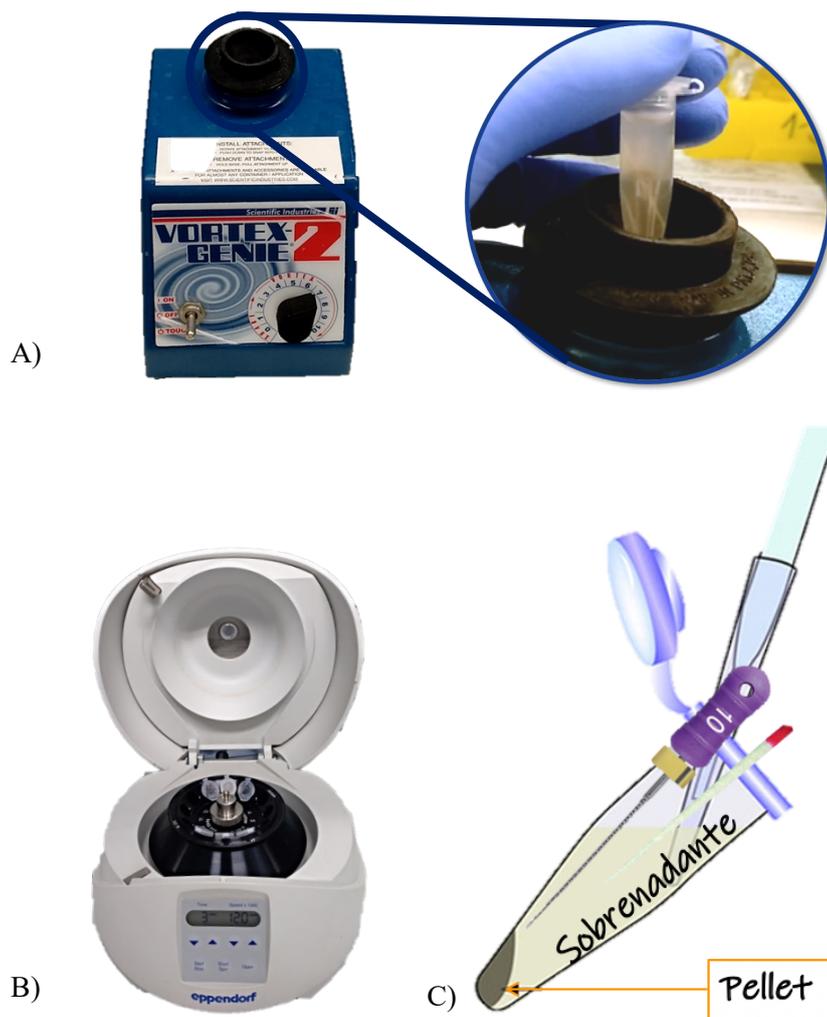


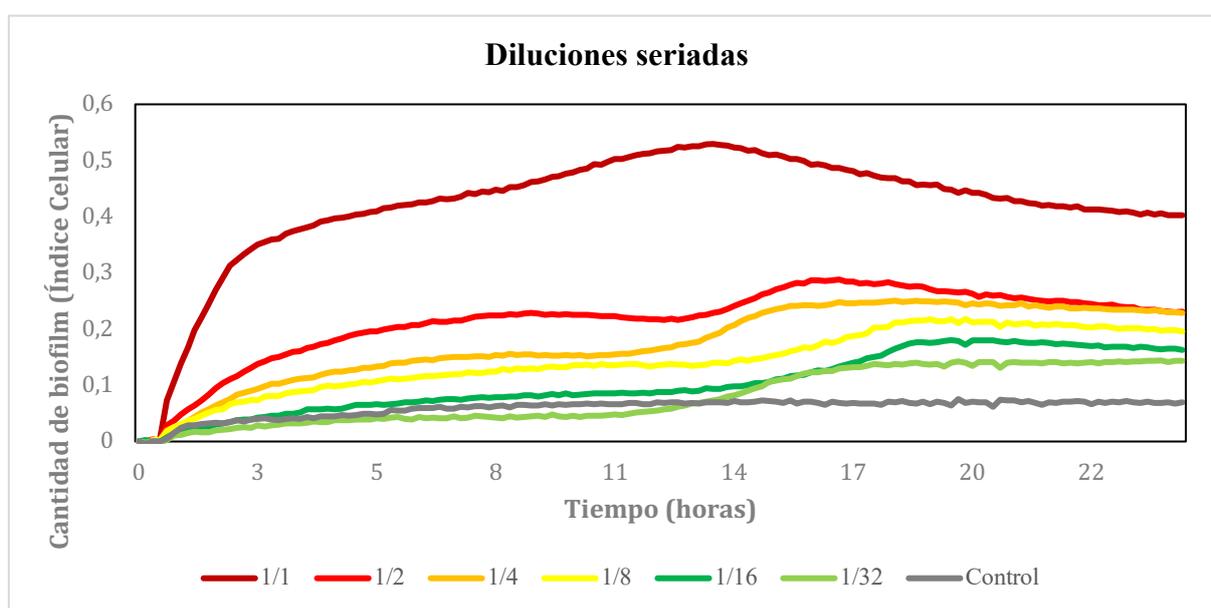
Figura M.3. Conjunto de imágenes representativas del procesado de la muestra. A) Imagen del vórtex utilizado durante 20 segundos para disgregar la muestra recogida de las limas y puntas de papel utilizadas. B) Centrifugadora con la que se consigue separar el “pellet” del sobrenadante, tras centrifugar durante 2 minutos a 6000 rpm el tubo Eppendorf que contiene la muestra. C) Esquema de los componentes del tubo Eppendorf tras centrifugar. Se observa el “pellet”, en el fondo del tubo Eppendorf, separado del sobrenadante, limas y puntas de papel.

5. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y PUESTA A PUNTO DEL SISTEMA

RTCA xCELLIGENCE® PARA MUESTRAS DE ORIGEN ENDODÓNTICO

5.1. Determinación de la cantidad mínima de muestra necesaria

De cada “pellet” se llevó a cabo una dilución seriada para determinar el número máximo de pocillos donde poder crecer la muestra, y así establecer el número de antibióticos posibles que se podían testar. Se estableció como concentración 1 la dilución del “pellet” de la muestra en 400 μ L. Se llevó a cabo el análisis del biofilm en el sistema RTCA (Real-Time Cell Analyzer) xCELLigence® utilizando concentraciones de suspensión celular correspondiente a: 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32. Tras la observación de las diferentes curvas de crecimiento se determinó como concentración óptima 1/2, por lo que el “pellet” de cada una de las muestras se resuspendió en 820 μ L (80 μ L para cada uno de los 8 pocillos de la placa de microtitulación 96X E-plate (ACEA Biosciences®) y 180 μ L para su secuenciación sin manipular). La gráfica M.1 muestra las curvas de crecimiento de las diferentes diluciones seriadas.



Gráfica M.1. Valores de impedancia equivalentes a la formación de biofilm de las diferentes diluciones de la muestra procedente de un mismo paciente. Concentración 1/1 = muestra sin diluir; concentración 1/2 = muestra diluida a la mitad; concentración 1/4 = muestra diluida a una cuarta parte; 1/8 = muestra diluida a una octava parte; 1/16 = muestra diluida a una dieciseisava parte; 1/32 = muestra diluida a una treintaidosava parte.

5.2. Análisis del biofilm en tiempo real. Determinación de la curva de crecimiento.

El análisis de biofilm en tiempo real se llevó a cabo con el sistema RTCA xCELLigence® siguiendo las instrucciones del fabricante (Atienza et al., 2005). Se llevó a cabo una medida de impedancia de referencia colocando 100 μ L de cada uno de los diferentes medios preparados (Med, MedA, MedMtr, MedAztr) en los pocillos de la placa de microtitulación 96X E-plate (ACEA Biosciences®) (figura M.4) siguiendo el protocolo estándar (Ferrer et al., 2017a). El pocillo con Med y suspensión celular, sin ningún antibiótico, constituye el control positivo.

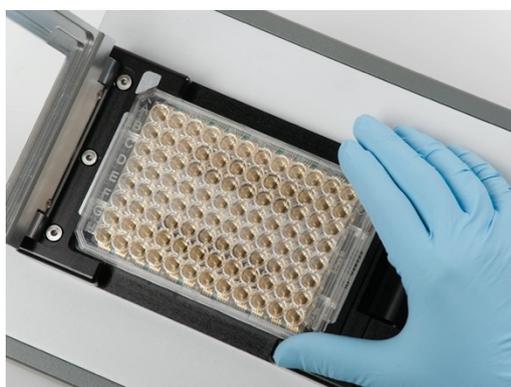


Figura M.4. Placa de microtitulación 96X E-plate (ACEA Biosciences®) en la que se coloca 80 μ L de suspensión celular en cada pocillo. La suspensión celular es obtenida tras eliminar el sobrenadante y añadir al “pellet” 820 μ L de Med.

A continuación, se añadieron 80 μ L de la suspensión celular, obtenida del donante, junto con 20 μ L de Med en la placa de microtitulación 96X E-plate. Cada muestra se llevó a cabo por duplicado, en un total de 8 pocillos. También se incluyeron controles negativos de Med, MedA, MedMtr y MedAztr, a fin de obtener valores de Índice Celular para cada uno de los medios de cultivo, ya que determinados antibióticos pueden afectar a la conductividad. Para generar condiciones de crecimiento anaeróbicas se colocó 50 μ L de aceite mineral estéril (Sigma M8410) sobre cada pocillo (figura M.5). Posteriormente, la placa E-plate fue colocada en el sistema RTCA xCELLigence®, incubado a 37° C, el cual tomó mediciones de impedancia cada 10 min durante 8 o 16 horas. Se utilizaron 12 muestras para establecer el pico máximo (fase estacionaria) de crecimiento de biofilm en las condiciones actuales, siendo analizadas hasta las 16 horas de crecimiento. Se estableció como momento máximo de crecimiento las 8 horas, por lo que el resto de las muestras (36) fueron analizadas hasta ese momento. Tras las 8 horas el

biofilm resultante fue secuenciado, no teniendo en cuenta la composición bacteriana tras 16 horas de procesado en el RTCA xCELLigence® debido a que el biofilm se encuentra en fase de declive (Gráfica M.2).

La impedancia del sensor celular se expresa como una unidad arbitraria llamada Índice Celular (CI. Cell Index), la cual representa una medida de la masa total de la biopelícula (Ferrer et al., 2017b). El CI en cada punto de tiempo tomado a una frecuencia de 10 kHz se define como $(Z_n - Z_b) / F$, donde Z_n es la impedancia del electrodo celular del pocillo cuando contiene células. Z_b es la impedancia preliminar solo con medios de crecimiento, y F está relacionado con 10Ω .

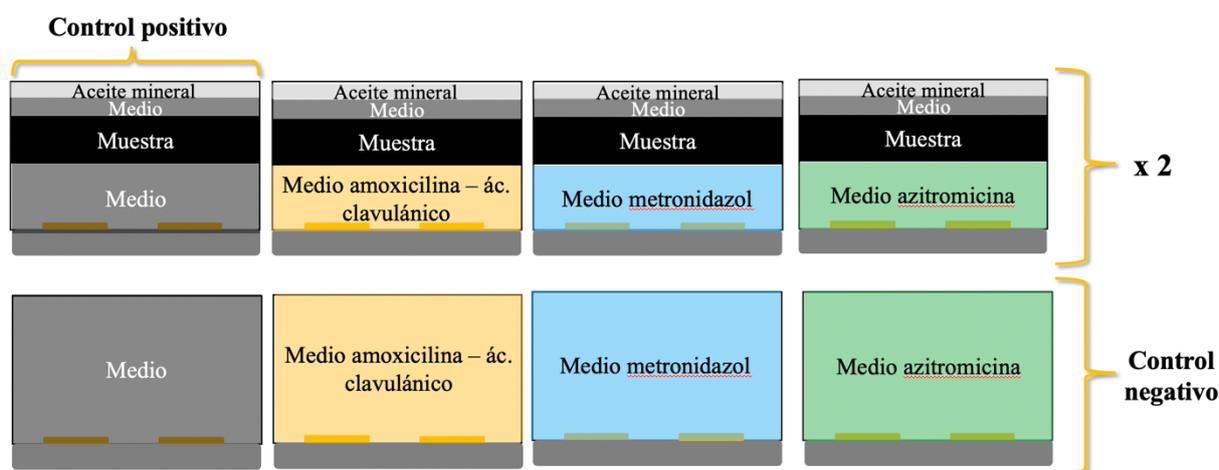
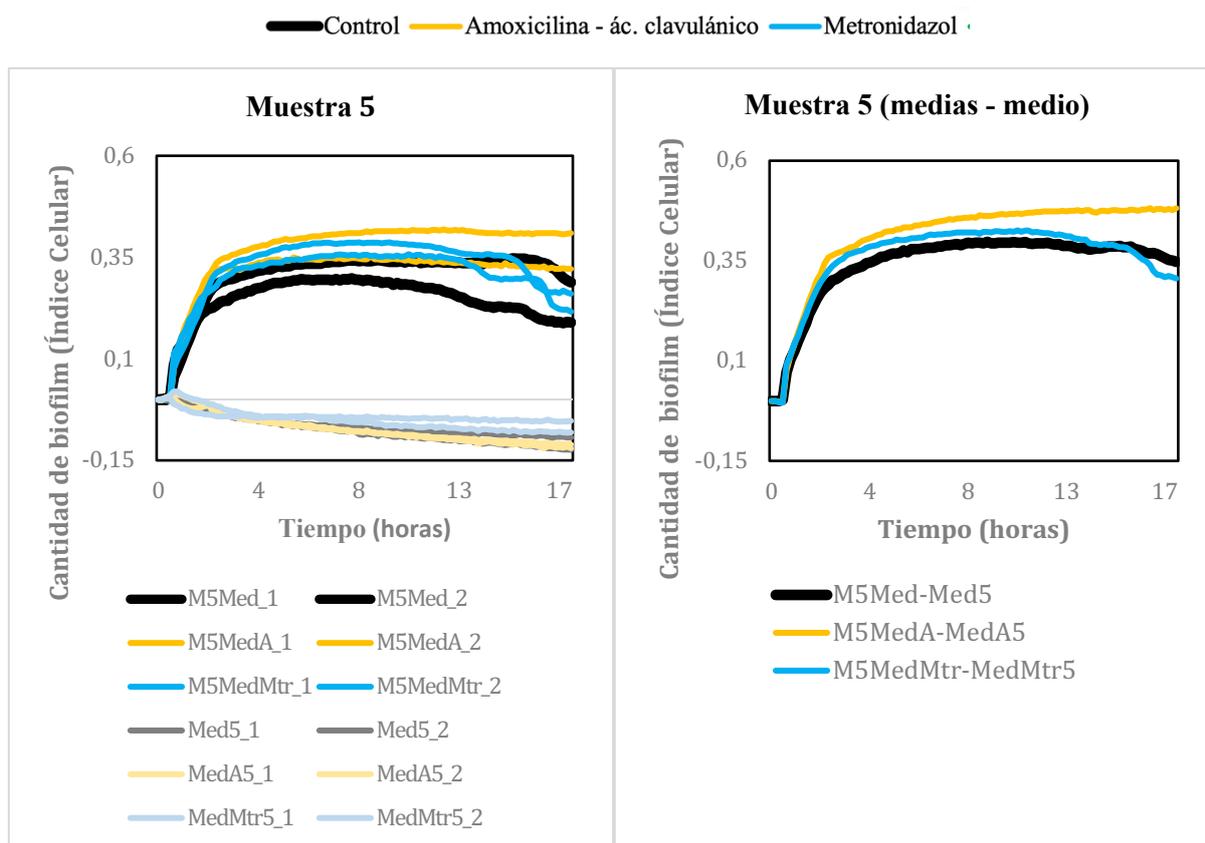


Figura M.5. Esquema de los pocillos de la placa E-plate, desde una vista coronal, y los diferentes componentes en cada uno de ellos.

Una vez obtenidos los valores de impedancia de cada uno de los pocillos se hizo la media de las réplicas. Cada medio de cultivo (Med, MedA, MedMtr, MedAztr) por sí mismo genera un valor de CI específico para cada uno de ellos. Para eliminar la influencia de cada uno de los medios de cultivo sobre el CI del biofilm formado, se restó a cada media de las réplicas con muestra el valor de CI de su medio correspondiente (gráfica M.2).



Gráfica M.2. Efecto de distintos antibióticos sobre la formación del biofilm de una muestra del interior del conducto radicular *in vitro*. Las curvas muestran los valores de Índice Celular de las muestras (M5) y sus respectivos medios de cultivo (Med) utilizados como control negativo. M5Med_1 = Muestra del paciente n° 5 con Med (BHI + HM + VitK) réplica 1. M5Med_2 = Muestra del paciente n° 5 con Med (BHI + HM + VitK) réplica 2. M5Med - Med5 = Muestra del paciente n° 5 con Med (BHI + HM + VitK) haciendo media de las réplicas tras restar los valores de impedancia de Med. La línea negra corresponde al control positivo.

De los 820 μL de suspensión celular, se utilizaron 640 μL en el sistema RTCA xCELLigence[®], los 180 μL restantes de inóculo se almacenaron a -20°C para su posterior secuenciación.

6. REMOCIÓN DEL BIOFILM DE LA PLACA DE MICROTITULACIÓN Y EXTRACCIÓN DEL ADN

Una vez cumplido el tiempo de estudio (8 horas), se recogió la biopelícula adherida a la superficie inferior del pocillo. Tras extraer la placa de la incubadora se retiró 100 μ L del sobrenadante. A continuación, se llevó a cabo un lavado sobre la superficie del fondo del pocillo con los 100 μ L restantes. Posteriormente, se realizó un último lavado con 100 μ L de agua estéril hasta que se logró la dispersión del material adherido. El material obtenido de cada una de las réplicas se guardó en el mismo tubo Eppendorf. La biopelícula desagregada se almacenó a -20°C hasta su procesado.

El ADN se extrajo con el instrumento MagnaPure LC JE379 y el Kit de aislamiento de ADN MagnaPure LC (Roche®) siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. En concreto, a la muestra almacenada se le añadió 100 μ L de PBS, fue introducida en una cuba de ultrasonidos durante 45 segundos y sometida a un spin durante 10 segundos. A continuación, se añadió 130 μ L de lysis buffer y 10 μ L de un cocktail de enzimas (2,5 μ L de lisozima, 2,5 μ L mutanolisina, 2,5 μ L de lisostafina y 2,5 μ L de H₂O miliQ) por muestra. Posteriormente, se mantuvo la muestra en ligera agitación (300 rpm) 1 horas a 37°C. En el siguiente paso, se añadieron 20 μ L de proteinasa K y fue incubado 15 minutos a 65°. Finalmente, se incubó 10 minutos a 95°, se llevó a cabo un spin de 10 segundos y se transfirió la muestra a la placa correspondiente y se introdujo en el Magnapure LC para finalizar la extracción del ADN (Dzidic et al., 2018; Mira et al., 2019) (figura M.6).



Figura M.6. Magnapure LC JE379 utilizado para la extracción del ADN del biofilm obtenido tras la incubación de la placa E-plate. Antes del procesado con el robot, las muestras fueron incubadas con un cocktail de enzimas para aumentar la lisis química.

7. AMPLIFICACIÓN DEL GEN 16S ARN RIBOSOMAL Y SECUENCIACIÓN

Se realizó una biblioteca de amplicones de Illumina siguiendo el protocolo de Illumina de preparación de la biblioteca de secuenciación metagenómica del gen 16S ARNr (Parte #15044223 Rev.A). Las secuencias de cebador específicas del gen utilizadas en este protocolo se dirigen a las regiones V3 y V4 del gen 16S ARNr, lo que resulta en un único amplicón de aproximadamente 460 pares de bases (pb) (Dzidic et al., 2018; Mira et al., 2019). Se utilizaron secuencias de adaptador Illumina junto con las secuencias de cebadores para compatibilidad con el índice Illumina y los adaptadores de secuenciación. Después de la amplificación del gen 16S ARNr, el ADN fue secuenciado en un secuenciador MiSeq de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Illumina) usando el protocolo de extremo pareado de 2×300 pb (Mira et al., 2019).

Solo se usaron lecturas superpuestas (es decir que se solaparan) para el análisis. La evaluación de la calidad de las secuencias se llevó a cabo utilizando el programa PRINSEQ (Schmieder & Edwards, 2011; Mira et al., 2019). No se consideraron secuencias de <350 nucleótidos de longitud. El corte del final de las lecturas, que es la más sujeta a errores de secuenciación, se realizó cortando nucleótidos con una calidad media <30 en ventanas de 20 pb. Las regiones quiméricas en el gen 16S rRNA, que corresponden a artefactos de la PCR, se filtraron utilizando el programa USEARCH (Edgar, 2016; Mira et al., 2019). Las secuencias obtenidas fueron clasificadas taxonómicamente por el clasificador RDP (Wang et al., 2007; Mira et al., 2019) donde las lecturas fueron asignadas a nivel de género. Las secuencias también fueron asignadas a nivel de especie pero hay que tener en cuenta que las secuencias del gen 16S en la región amplificada son muy similares entre distintas especies de determinados géneros (por ejemplo los *Streptococcus*) y por tanto esta asignación a un menor nivel taxonómico son menos fiables y sujetas a error, mientras que la asignación a nivel de género es muy robusta (ver, por ejemplo, Claesson et al., 2010).

8. Análisis descriptivo

Para calcular la **composición bacteriana general** del interior de los conductos de las muestras recogidas se secuenciaron los inóculos (180 μ L de la suspensión celular sin colocar en el sistema RTCA xCELLigence[®]) y se calculó la abundancia media de los phyla y géneros. Además, se compararon los valores medios de proporción de los distintos grupos taxonómicos, a nivel de phyla y de género, obtenidos en el inóculo y en el control positivo (Med). De esta forma se puede valorar la posible alteración de la composición por el efecto de las condiciones de cultivo *in vitro* en el sistema RTCA xCELLigence[®].

Se calculó el porcentaje de inhibición o estimulación de formación de biofilm, en comparación con el control positivo (muestra de biofilm recogida de los pocillos de la placa de microtitulación del sistema RTCA xCELLigence[®] en ausencia de antibiótico), en el sistema *in vitro* RTCA xCELLigence[®]. Se consideró que un antibiótico no produce efecto cuando la inhibición o estimulación es menor al 10%. En base a estos datos se clasificaron las muestras en 4 patrones de crecimiento diferentes. A continuación, se agrupó las abundancias medias de los géneros según el patrón de crecimiento.

También se analizó la composición bacteriana en función del efecto del antibiótico aplicado. Se calculó la proporción media de los géneros bacterianos agrupando las muestras en función de si la amoxicilina – ác. clavulánico, el metronidazol y la azitromicina provocaron inhibición, estimulación o no influyeron en la formación de biofilm en el sistema RTCA xCELLigence[®].

Además, se comparó la composición bacteriana y el efecto de los antibióticos sobre la formación de biofilm de pacientes de los cuales se obtuvo muestra de dos dientes diferentes.

Finalmente, se secuenció la composición bacteriana del interior de los conductos necróticos de 4 pacientes que habían tomado antibiótico en el último mes.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el análisis canónico de correspondencia y la prueba ADONIS para comparar la composición bacteriana de las diferentes muestras y el efecto de los antibióticos testados sobre el biofilm de origen endodóntico obtenido en el sistema RTCA xCelligence®. Además, se contrastó la composición bacteriana de pacientes que no habían tomado antibiótico previo a la toma de muestra, con respecto a pacientes que sí habían tomado antibiótico.

También se llevó a cabo el test de Wilcoxon para comparar la proporción media de los géneros más abundantes en el inóculo, en el control positivo y tras la aplicación de amoxicilina - ác. clavulánico, metronidazol o azitromicina. Los análisis de CCA y Wilcoxon se realizaron con R, usando los paquetes Vegan (Oksanen et al., 2015) y ade4 (Drav et al., 2015). Además, se realizó la prueba del chi cuadrado para estudiar la relación entre los diferentes aspectos clínicos y el crecimiento de biofilm tras la aplicación de los diferentes antibióticos. También, se utilizó el test de U de Mann-Whitney para comparar los datos clínicos de los pacientes con la proporción de los géneros más abundantes.

RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES SELECCIONADOS

El tamaño muestral inicial fue de 48 muestras, obtenidas a partir de 48 dientes diferentes pertenecientes a 42 pacientes que no habían tomado antibiótico en el último mes. Hubo 6 pacientes de los cuales se obtuvo muestra de dos dientes diferentes. En un 14,6% de las muestras obtenidas (7/48) no se obtuvo suficiente cantidad de muestra para formar biofilm. Asimismo, se descartó una muestra por contaminación por *Bacillus*. Por lo tanto, el tamaño muestral final fue de 40, siendo el 42,5% de las muestras procedentes de hombres y el 57,5% de mujeres. La edad de los pacientes osciló entre 18 y 81 años con una edad media de $44,6 \pm 17,1$ años. En la tabla R.1.1 se resumen los datos clínicos.

De entre las 40 muestras obtenidas, fueron secuenciadas 28 mediante el sistema Illumina, las muestras secuenciadas fueron obtenidas a partir de 23 pacientes diferentes. La edad de los pacientes osciló entre 20 y 81 años con una edad media de $47,2 \text{ años} \pm 18,5$. El 43% fueron hombres y el 57% mujeres. En la tabla R.1.2 se resumen los datos clínicos. De las 31 muestras incluidas procesadas a 8 horas en el RTCA xCELLigence® se secuenciaron 25. Para maximizar las posibilidades de relacionar la composición bacteriana con el resultado del antibiótico, se seleccionaron las muestras de aquellos biofilms donde el efecto antibiótico hubiera sido más acusado, descartando 6 muestras por tener una inhibición o inducción del biofilm mínima. Por cada una de estas 25 muestras se obtuvo la composición resultante de:

- Inóculo: muestra recogida del paciente y almacenada a -20°C para su secuenciación.
- Control positivo: biofilm formado en los pocillos del control positivo tras el RTCA xCELLigence®.
- Amoxicilina – ác. clavulánico: biofilm formado tras el RTCA xCELLigence® en los pocillos en los que se aplicó amoxicilina – ác. clavulánico.
- Metronidazol: biofilm formado tras el RTCA xCELLigence® en los pocillos en los que se aplicó metronidazol.
- Azitromicina: biofilm formado tras el RTCA xCELLigence® en los pocillos en los que se aplicó azitromicina.

De las 4 muestras a 8 horas excluidas por la no formación de biofilm se secuenció el inóculo de 3 de ellas, debido a que estas muestras corresponden a 3 pacientes de los cuales se

obtuvo muestra de dos dientes diferentes y una de esas muestras fue incluida entre las 25 muestras secuenciadas, de esta forma se posibilita la comparación de la composición bacteriana de dientes diferentes de un mismo paciente. El proceso de selección de las muestras procesadas en el RTCA xCelligence® y secuenciadas se describe en la figura R.1.

El tamaño muestral final de muestras recogidas en pacientes que habían tomado antibiótico en el último mes fue de 4. El 50 % fueron hombres y el 50% mujeres. La edad de los pacientes osciló entre 21 y 64 años, siendo la edad media de 41,7 años \pm 13,2 años. En la tabla R.1.3 se resumen los datos clínicos.

n=40	Caries	Dolor	Área radiolúcida	Antecedente de traumatismo	Supuración	Percusión	
No	29 (72,5%)	35 (87,5%)	13 (32,5%)	32 (80,0%)	37 (92,5%)	Negativa 31 (77,5%)	
Sí	11 (27,5%)	4 (12,5%)	27 (67,5%)	8 (20,0%)	3 (7,5%)	Positiva 9 (22,5%)	
Incisivos y caninos 22 (55%)			Premolares 14 (35%)		Molares 4 (10%)		
Incisivo superior	Incisivo infeior	Canino superior	Canino inferior	Premolar superior	Premolar infeior	Molar supeior	Molar infeior
11 (27,5%)	8 (20%)	1 (2,5%)	2 (5%)	7 (17,5)	7 (17,5%)	2 (5%)	2 (5%)

Tabla R.1.1. Datos clínicos de los pacientes incluidos en el estudio cuyas muestras formaron biofilm en el sistema *in vitro*.

n=28	Caries	Dolor	Área radiolúcida	Antecedente de traumatismo	Supuración	Percusión	
No	25 (89,3%)	26 (92,9%)	7 (25,0%)	22 (78,6%)	26 (92,9%)	Negativa 26 (92,9%)	
Sí	3 (10,7%)	2 (7,1%)	21 (75,0%)	6 (21,4%)	2 (7,1%)	Positiva 2 (7,1%)	
Incisivos y caninos 17 (60,7%)			Premolares 10 (35,7%)		Molares 1 (3,6%)		
Incisivo superior	Incisivo infeior	Canino superior	Canino inferior	Premolar superior	Premolar infeior	Molar supeior	Molar infeior
9 (32,1%)	6 (21,4%)	0 (0%)	2 (7,1%)	4 (14,3)	6 (21,4%)	0 (0%)	1 (3,6%)

Tabla R.1.2. Datos clínicos de los pacientes cuyo inóculo fue secuenciado.

n=4	Caries	Dolor	Área radiolúcida	Antecedente de traumatismo	Supuración	Percusión
No	4 (100%)	3 (75%)	0 (0%)	4 (100%)	3 (75%)	Negativa 3 (75%)
Sí	0 (0%)	1 (25%)	4 (100%)	0 (0%)	1 (25%)	Positiva 1 (25%)

n° muestra						Finalizado (días)
22	Canino superior	Amoxicilina - ác. clavulánico	875/125 cada 8 horas	1 semana		2
30	Molar inferior	Amoxicilina - ác. clavulánico	875/125 cada 8 horas	1 semana		17
33	Incisivo inferior	Amoxicilina - ác. clavulánico	875/125 cada 8 horas	1 semana		7
34	Incisivo inferior	Clindamicina 600 mg	cada 8 horas	5 días		1

Tabla R.1.3. Datos clínicos de los pacientes que habían tomado antibiótico cuyo inóculo fue secuenciado. Finalizado (días) = número de días que transcurrieron desde que finalizó la toma de antibiótico hasta la toma de muestra del interior de los conductos radiculares.

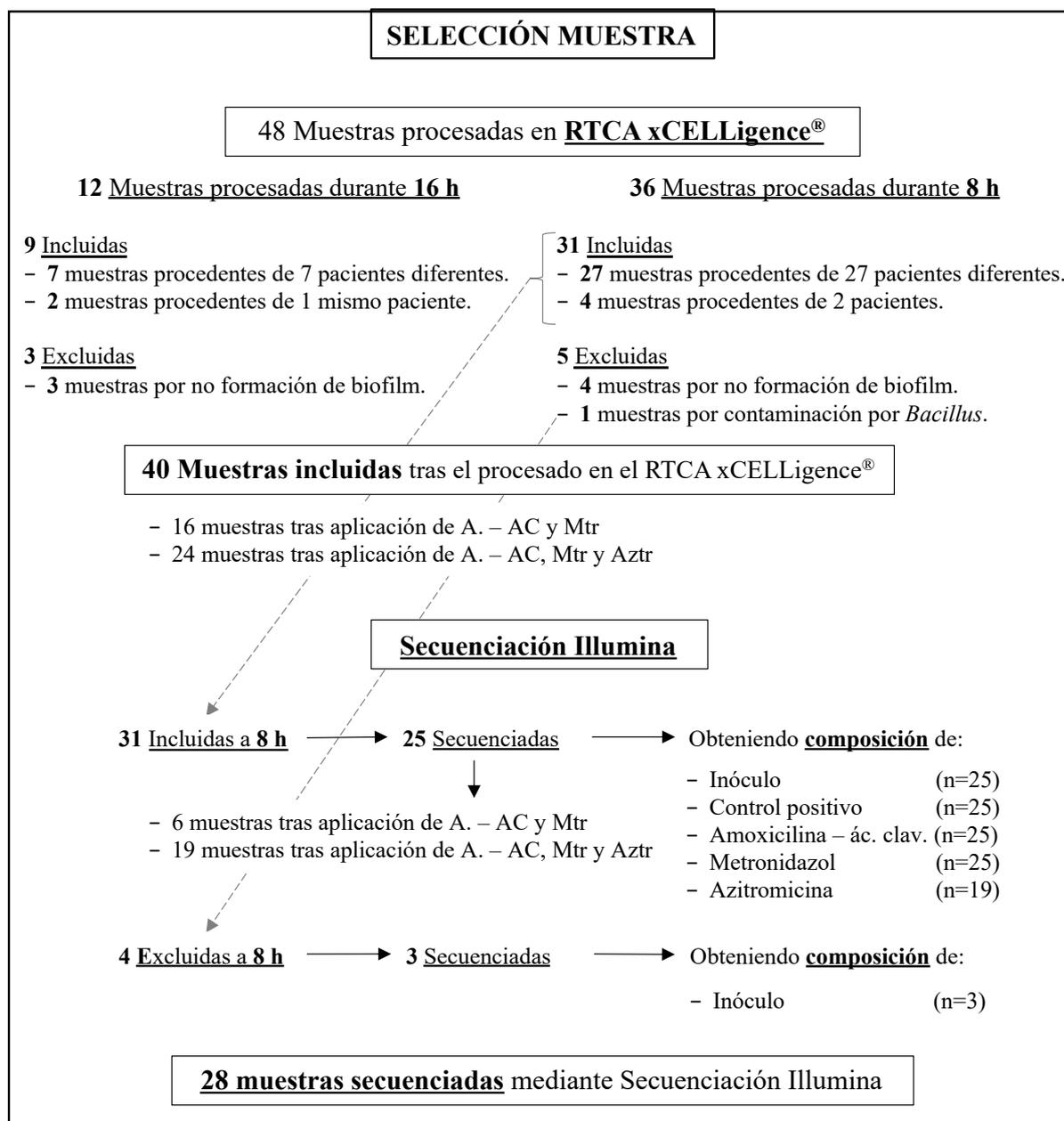


Figura R.1. Desarrollo del proceso de selección de las muestras incluidas y excluidas procesadas en el RTCA xCELLigence® y secuenciadas mediante Illumina. A. AC = Amoxicilina – ácido clavulánico, Mtr = Metronidazol, Aztr = Azitromicina.

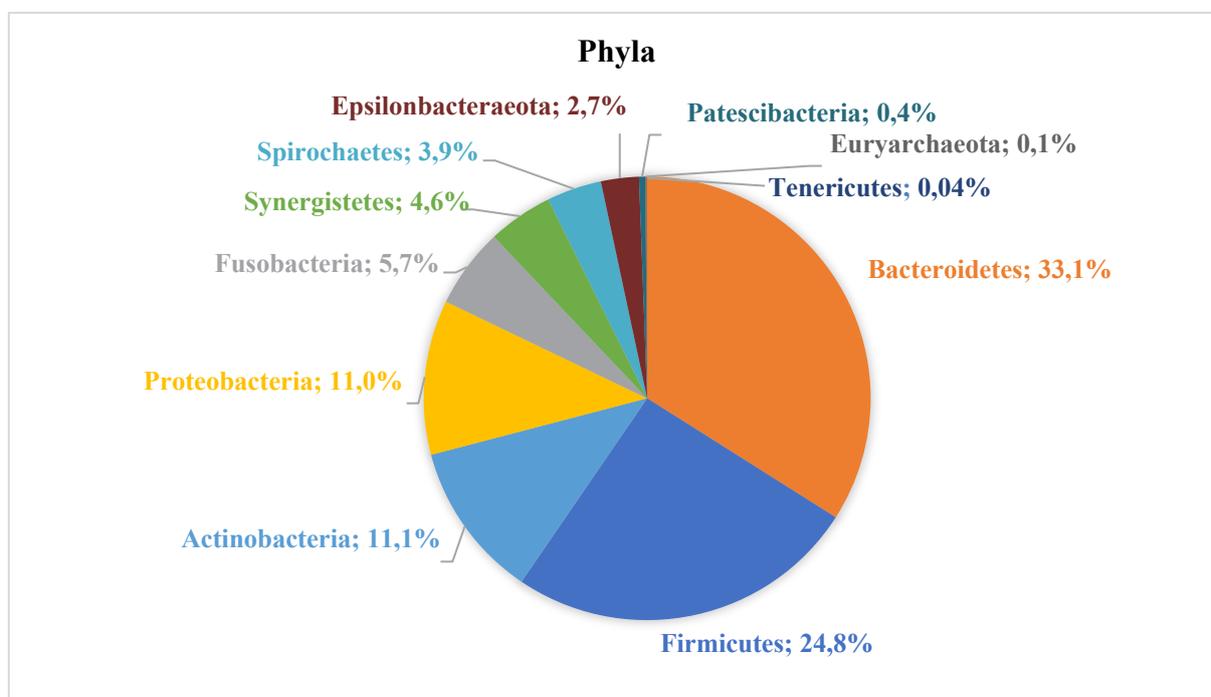
2. COMPOSICIÓN BACTERIANA DE LOS CONDUCTOS RADICULARES

2.1. Composición bacteriana general

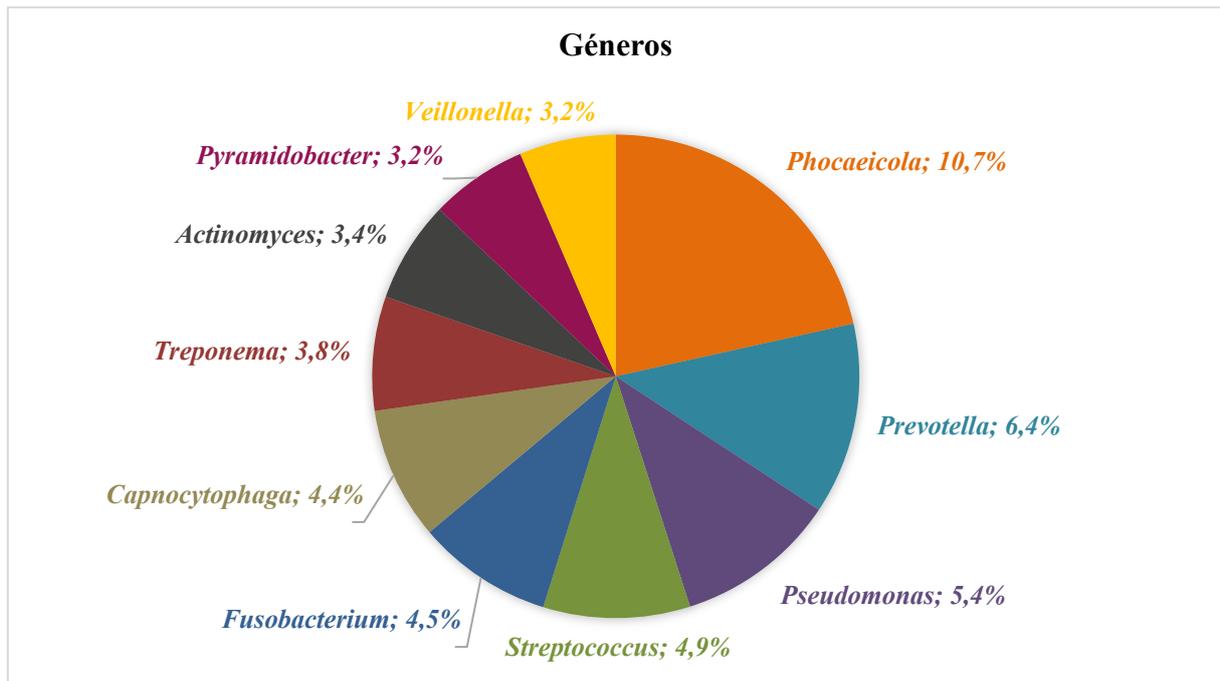
Tras el análisis de la composición microbiana del interior de los conductos radiculares de un total de 28 dientes necróticos procedentes de 23 pacientes diferentes se han detectado 10 phyla y 86 géneros con una proporción >1% en alguna de las 28 muestras secuenciadas. Los phyla se distribuyen en una proporción media como sigue: Bacteroidetes (33,1%), Firmicutes (24,8%), Actinobacteria (11,1%), Proteobacteria (11,0%) y Fusobacteria (5,7%) (gráfica R.2.1.1).

Respecto a los géneros con mayor proporción media en las muestras se encuentran: *Phocaeicola* (10,7%), *Prevotella* (6,4%), *Pseudomonas* (5,4%), *Streptococcus* (4,9%) y *Fusobacterium* (4,5%) (gráfica R.2.1.2).

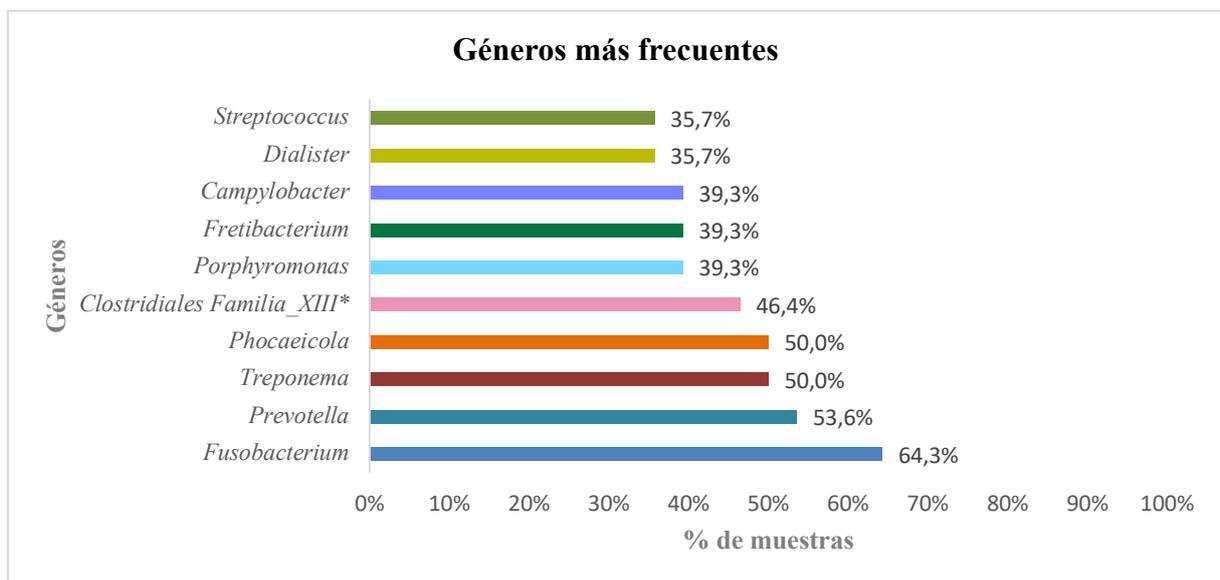
Si se analiza la prevalencia de los diferentes géneros en las muestras recogidas, *Fusobacterium* se halla presente en el 64,3% de las muestras, *Prevotella* en el 53,6%, *Teponema* y *Phocaeicola* en el 50%, Clostridiales Familia_XIII* en el 46,4%, mientras que *Porphyromonas*, *Fretibacterium* y *Campylobacter* se encuentran presentes en el 39,3% de los dientes estudiados. La gráfica R.2.1.3 ilustra estos datos.



Gráfica R.2.1.1. Proporción media de los phyla encontrados en el interior de los 28 sistemas de conductos radiculares necróticos mediante secuenciación Illumina.



Gráfica R.2.1.2. Representación gráfica de la proporción media de los géneros encontrados en el interior de los 28 sistemas conductos radiculares necróticos mediante secuenciación Illumina.

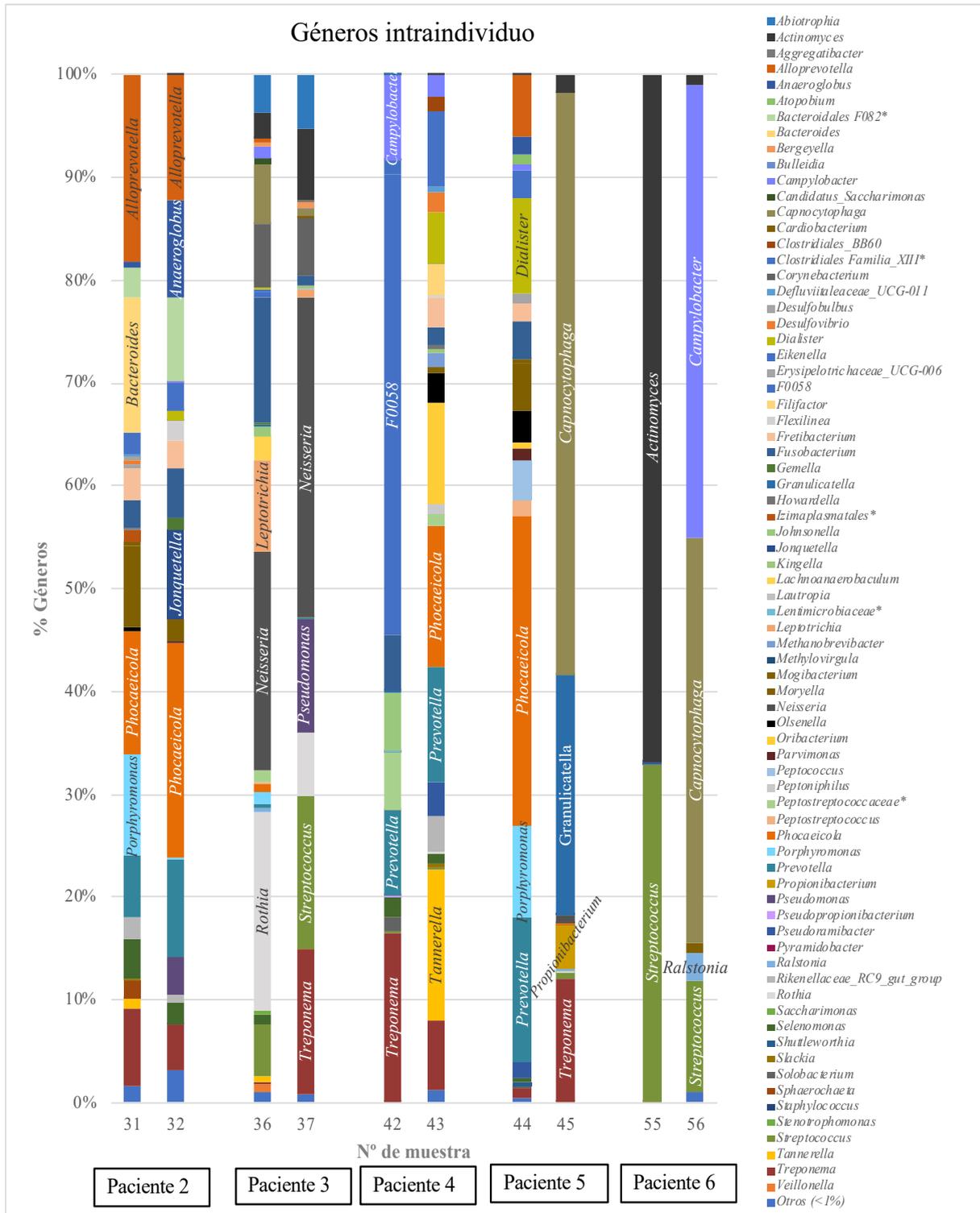


Gráfica R.2.1.3. Representación gráfica de los géneros más frecuentemente encontrados en el interior de los 28 sistemas de conductos radiculares necróticos mediante secuenciación Illumina. Se considera que el género está presente cuando se encuentra en una proporción > al 1%. El asterisco indica que no se ha podido asignar a nivel de género, por lo que se indica el nivel filogenético anterior.

Se puede afirmar que las infecciones de origen endodóntico están causadas por más de una bacteria. En las muestras seleccionadas se ha identificado una media de 12 géneros diferentes (abundancia mayor al 1%) en cada una de ellas: en todas hubo un mínimo de 2 géneros y un máximo de 21. La mayoría de las muestras presentaron de 4 a 11 o de 14 a 19 géneros diferentes con una abundancia mayor al 1%. La suma de los 4 géneros más abundantes de cada muestra representa de media un 72% de la carga bacteriana total. No se ha identificado ninguna bacteria presente en todas las muestras, siendo *Fusobacterium* la más frecuente con un 64,3%. Cabe destacar la abundancia media de *Phocaeicola* en un 10,7% y presente en el 50% de las muestras. Se trata de una bacteria anaerobia estricta aislada por primera vez en un absceso del cerebro en una mujer de 76 años tras una intervención quirúrgica (Al Masalma et al., 2009). En el presente estudio la infección endodóntica se encuentra formada por anaerobios y anaerobios facultativos, entre los que destacan, por su elevada abundancia y prevalencia: *Phocaeicola*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Fusobacterium* y *Treponema* (Al Masalma et al., 2009; Siqueira Jr & Roças, 2009; Scannapieco et al., 2013; Sakko et al., 2016; Brennan & Garret, 2019).

2.2. Composición bacteriana intraindividuo

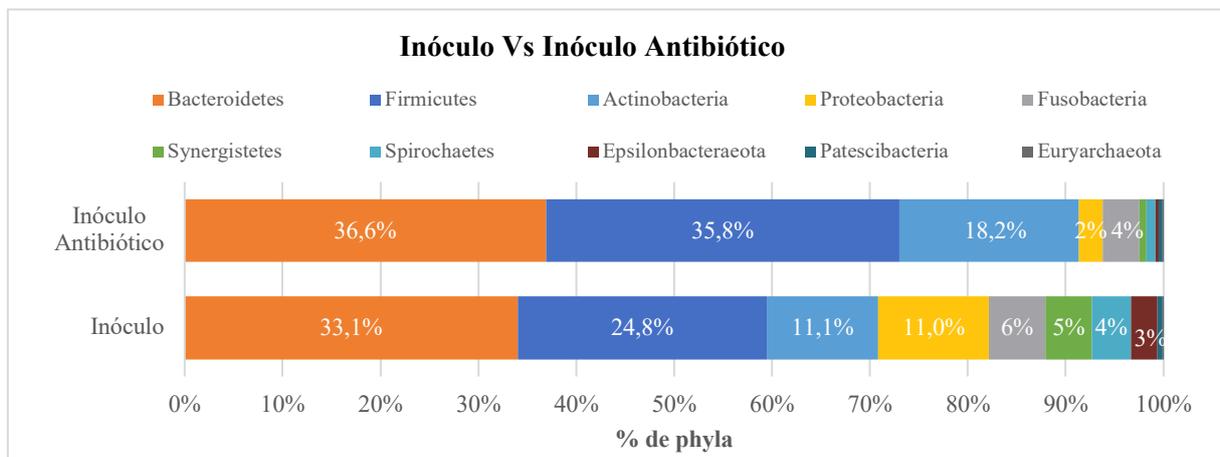
Hubo 6 pacientes de los que se obtuvo muestra de 2 dientes diferentes. Tras la comparación de la abundancia bacteriana de estos pacientes (en el caso del paciente nº 1 no se reservó parte de la muestra para su secuenciación posterior) se observa que la composición bacteriana del interior de los conductos es diente dependiente. En todos los casos, las 2 muestras del mismo paciente son diferentes en composición. Sin embargo, se observa que, en todos los casos menos en el paciente nº5, existe de 1 a 2 géneros que se encuentran en ambas muestras del mismo paciente de forma predominante. De tal forma que, el paciente número 2 presenta en las dos muestras *Alloprevotella* y *Phocaeicola* entre los 4 géneros más predominantes, el paciente número 3 *Neisseria*, el paciente número 4 *Prevotella*, y por último, en las 2 muestras del paciente número 6 se detecta *Streptococcus* en una alta proporción (gráfica R.2.2.1).



Gráfica R.2.2.1. Representación gráfica del % de géneros presentes en el inóculo de los pacientes de los cuales se obtuvo 2 muestras de 2 dientes diferentes. Se muestra en la gráfica el nombre los 4 géneros más abundantes de cada muestra. Los asteriscos indican que no se ha podido asignar a nivel de género, por lo que se indica el nivel filogenético anterior.

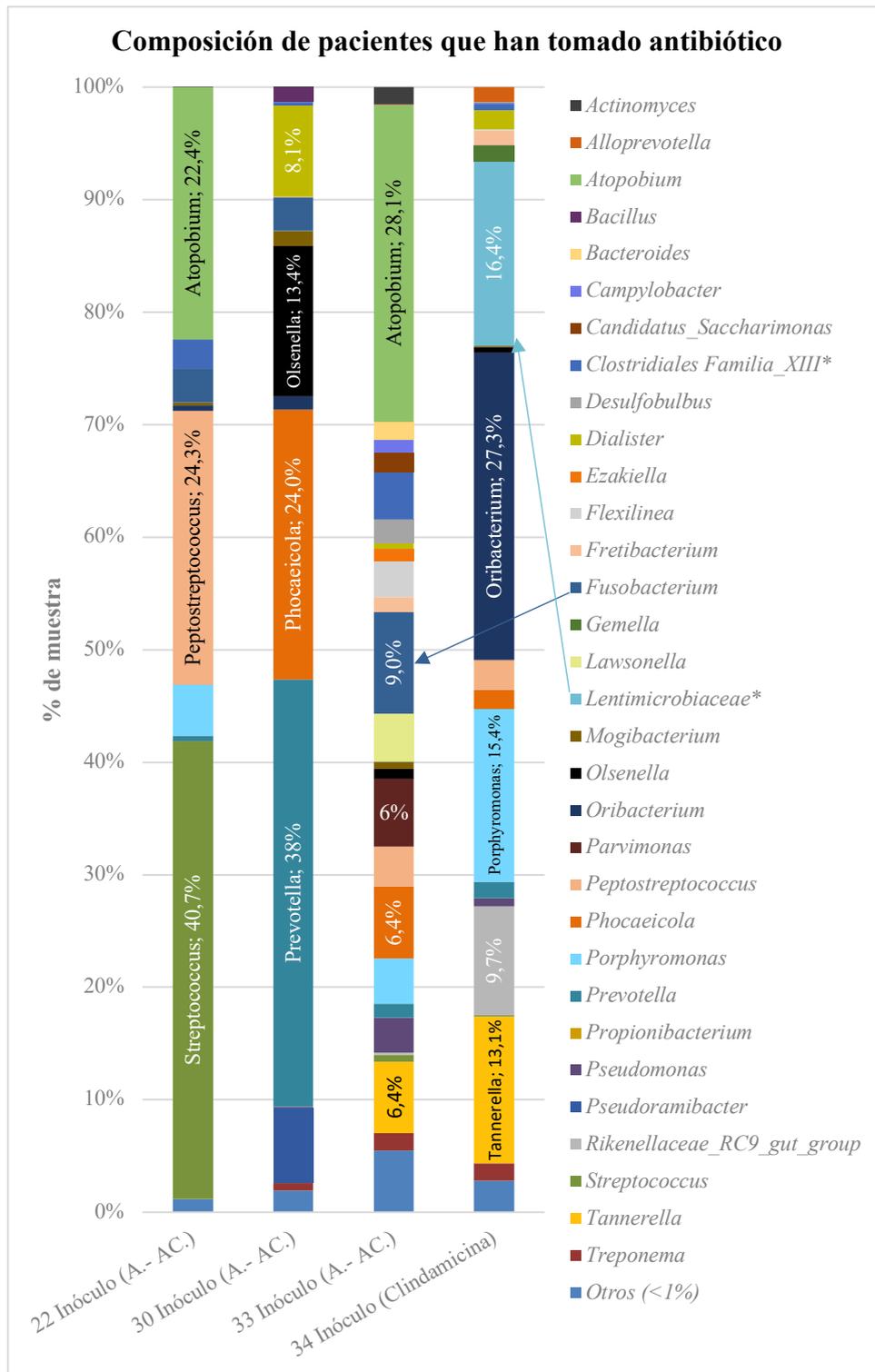
2.3. Composición bacteriana de pacientes tras tratamiento antibiótico

Tras el análisis de la composición de los pacientes que han tomado antibiótico en el último mes, se observa que existe un menor número de phyla, con una proporción media mayor al 1%, en comparación con los pacientes que no han tomado antibiótico, en concreto 5 phyla y 8 phyla respectivamente. Esto se debe a la disminución de Synergistetes, Spirochaetes y Epsilonbacteraeota en los pacientes tratados con antibiótico. Además, se observa una disminución de Proteobacterias del 11 al 2% en las muestras con tratamiento antibiótico. Sin embargo, existe un aumento de Bacteroidetes del 33,1 al 36,6%, de Firmicutes del 24,8% al 35,8% y Actinobacteria del 11,1 al 18,2% (gráfica R.2.3.1).



Gráfica R.2.3.1. Representación gráfica de la proporción media de los phyla encontrados en el inóculo de pacientes que no han tomado antibiótico en el último mes y los obtenidos a partir del inóculo de pacientes que sí han tomado antibiótico (n=4).

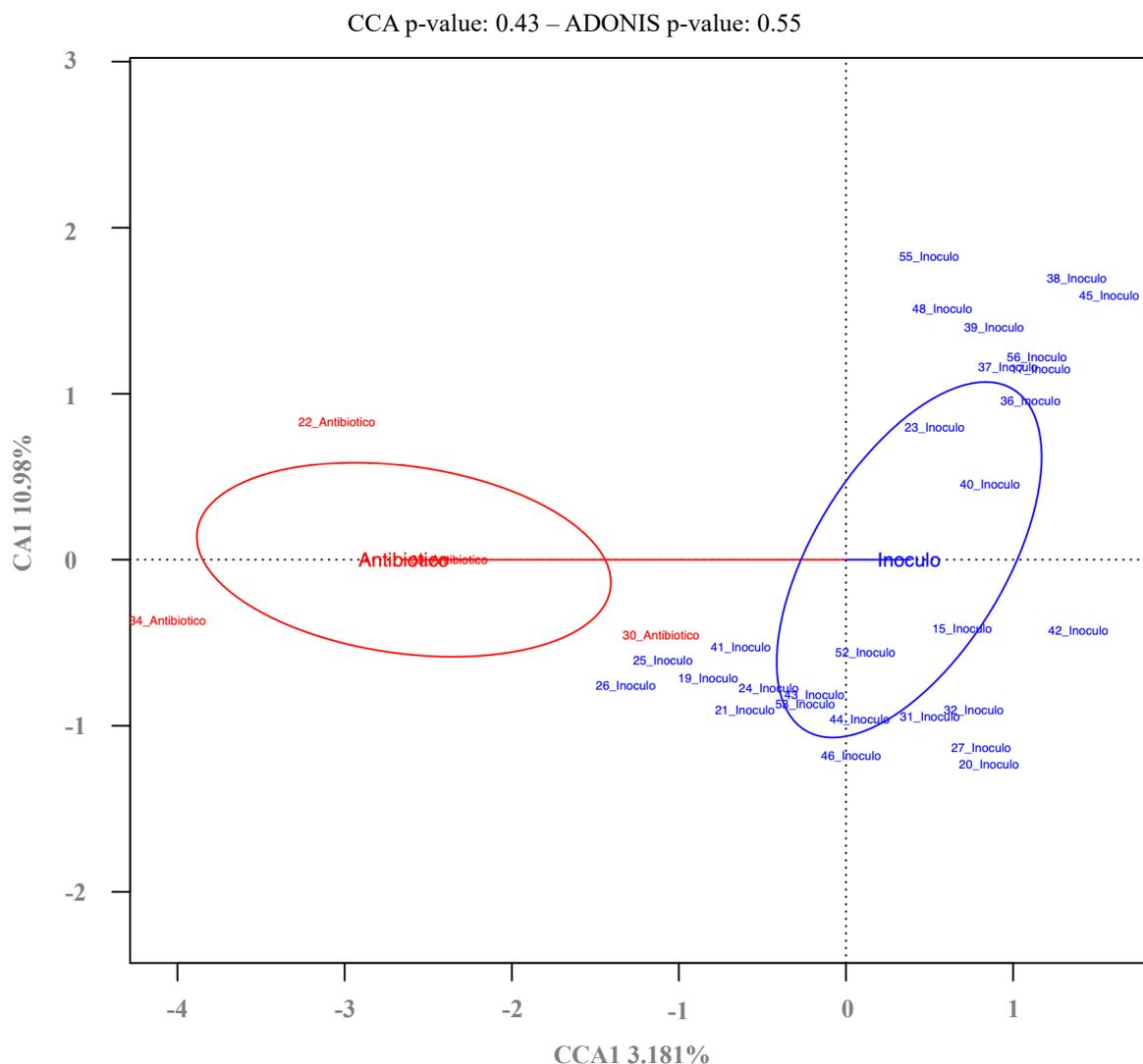
Existe una gran variabilidad, en cuanto a géneros, entre las 4 muestras de pacientes que han tomado antibiótico en el último mes. El único género que se encuentra en más de una muestra de manera predominante es *Atopobium*. Los géneros más predominantes son: *Streptococcus*, *Prevotella*, *Phocaeicola*, *Atopobium* y *Oribacterium* (gráfica R.2.3.2).



Gráfica R.2.3.2. Representación gráfica de las abundancias de los géneros presentes en las muestras obtenidas de pacientes que han tomado antibiótico en el último mes. A. – AC. = Amoxicilina – ác. clavulánico.

Se ha llevado a cabo un análisis canónico de correspondencia (CCA) de los 28 inóculos de pacientes que no habían tomado antibiótico para comparar su composición bacteriana con la de los 4 inóculos de pacientes que sí habían tomado antibiótico antes de la recogida de muestra.

La gráfica R.2.3.3 representa los resultados del CCA, el cual sugiere que las 4 muestras procedentes de pacientes que han tomado antibiótico son más parecidas entre sí, diferenciándose de las 28 muestras de pacientes que no han tomado antibiótico previo a la toma de muestra. Sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa, ni por el test de CCA ni por el test de Adonis. Además, la muestra número 30 con antibiótico presenta una composición muy similar a la de otras sin antibiótico previo.



Gráfica R.2.3.3. Representación gráfica del CCA en función de si la muestra recogida procede de un paciente que había tomado antibiótico en el último mes (4 muestras) o no (28 muestras). Cada muestra ocupa una posición en el espacio en función de su composición bacteriana, ocupando una posición más cercana cuanto más se parecen y más alejada cuanto más se diferencian.

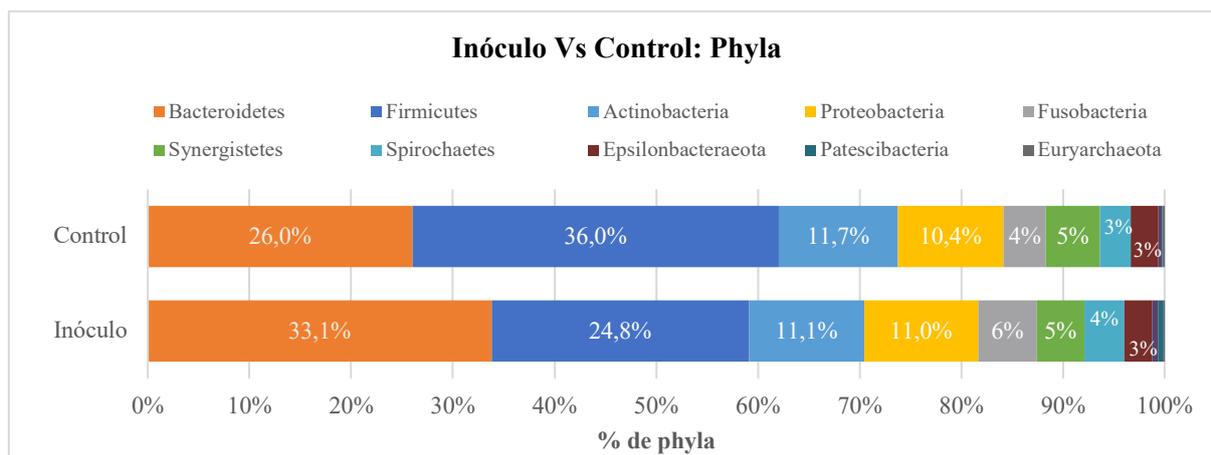
3. VALIDACIÓN DEL SISTEMA RTCA xCELLIGENCE® PARA MUESTRAS DE ORIGEN

ENDODÓNTICO

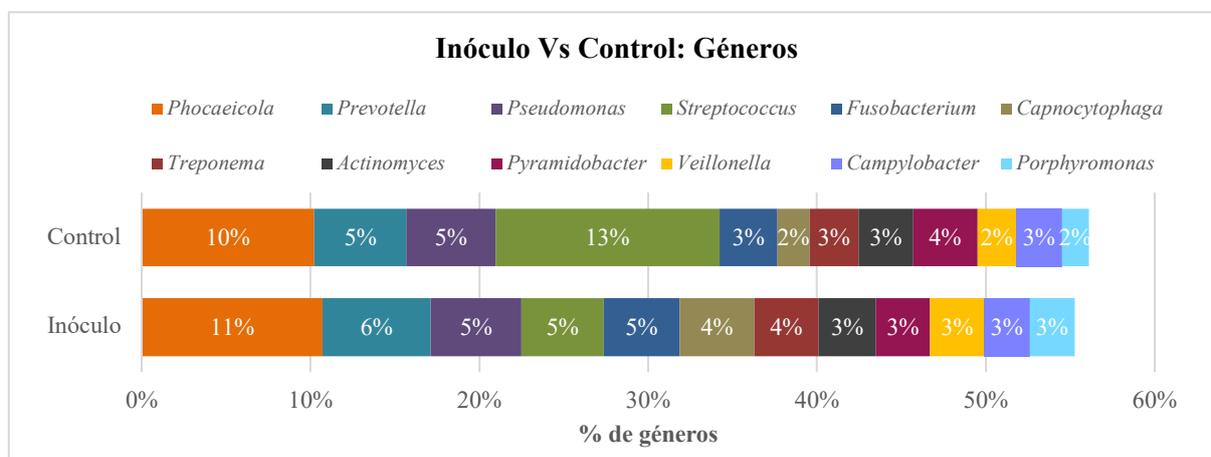
Se ha analizado el efecto basal del sistema RTCA xCelligence® sobre la composición del interior de los conductos radiculares. Se han comparado los phyla y géneros que se obtienen en el inóculo (muestra recogida del paciente y almacenada a -20° C hasta su secuenciación) y en el control positivo (muestra de biofilm recogida de los pocillos de la placa de microtitulación del sistema RTCA xCelligence® en ausencia de antibiótico), de un total de 25 muestras (se secuenciaron 28 muestras en total, pero en 3 de ellas sólo se obtuvo la composición bacteriana del inóculo, no secuenciando los biofilms resultantes debido a que no hubo crecimiento suficiente)

Respecto a los phyla tiene lugar un aumento del 45,1% de Firmicutes en el biofilm control con respecto al inóculo. Sin embargo, hay una disminución de Bacteroidetes del 21,5%. El resto de phyla se mantienen en valores similares (gráfica R.3.1). Se observa el crecimiento de organismos de difícil cultivo y de anaerobios estrictos, tales como las Espiroquetas (e.g. *Treponema*), *Porphyromonas* o *Fusobacterium*.

Las abundancias medias de los géneros se mantienen similares entre el inóculo y el control, excepto en el caso de los *Streptococcus* que aumentan del 5 al 13% en el biofilm control con respecto al inóculo (gráfica R.3.2). Este aumento de los Firmicutes, particularmente *Streptococcus*, es un fenómeno habitual en los experimentos de microcosmos, debido a que la presencia de azúcares en los medios de cultivo suele estimular el crecimiento de estos organismos fermentativos (Klug et al., 2016).

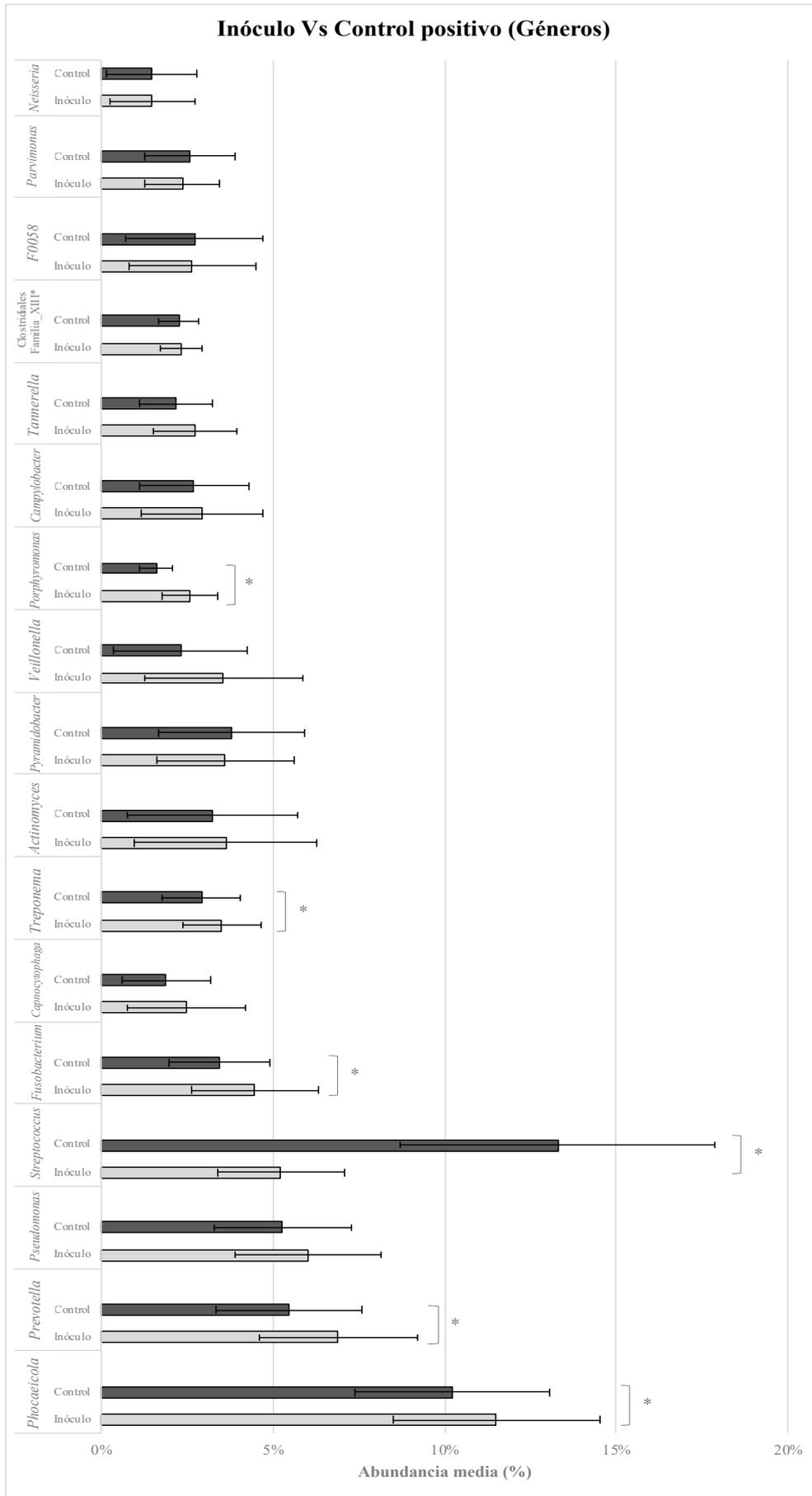


Gráfica R.3.1. Representación gráfica de la comparativa de la composición bacteriana a nivel de phylum en el inóculo y en el biofilm obtenido a partir del control positivo de 25 muestras diferentes.



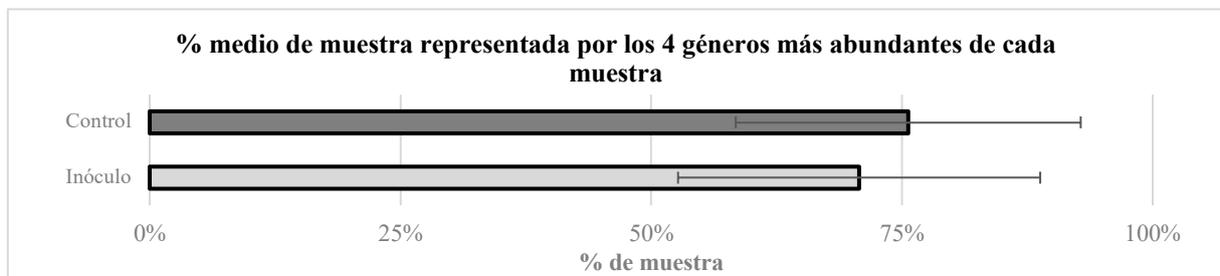
Gráfica R.3.2. Representación gráfica de la comparativa de los géneros más abundantes en el inóculo y en el biofilm obtenido a partir del control positivo de 25 muestras diferentes. Los datos muestran la media de cada uno de los géneros más abundantes.

Mediante el test de Wilcoxon se ha comparado la abundancia media de los 17 géneros más abundantes en el inóculo (abundancia >2%), con la abundancia de esos géneros en el control positivo. Se observa que no existe diferencia estadísticamente significativa en el 65% de los géneros, mostrando que el sistema permite el crecimiento de un biofilm que representa razonablemente bien la composición bacteriana del interior de los conductos radiculares. En cambio, *Phocaeicola*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Treponema* y *Porphyromonas* se detectaron en mayor cantidad en el inóculo que en el control positivo ($p < 0,05$). La diferencia más acentuada se encuentra en *Streptococcus*, el cual crece en mayor cantidad en el sistema RTCA xCelligence® (control positivo) que en el sistema de conductos radiculares (inóculo) ($p < 0,05$). Estos resultados se muestran en la gráfica R.3.3.

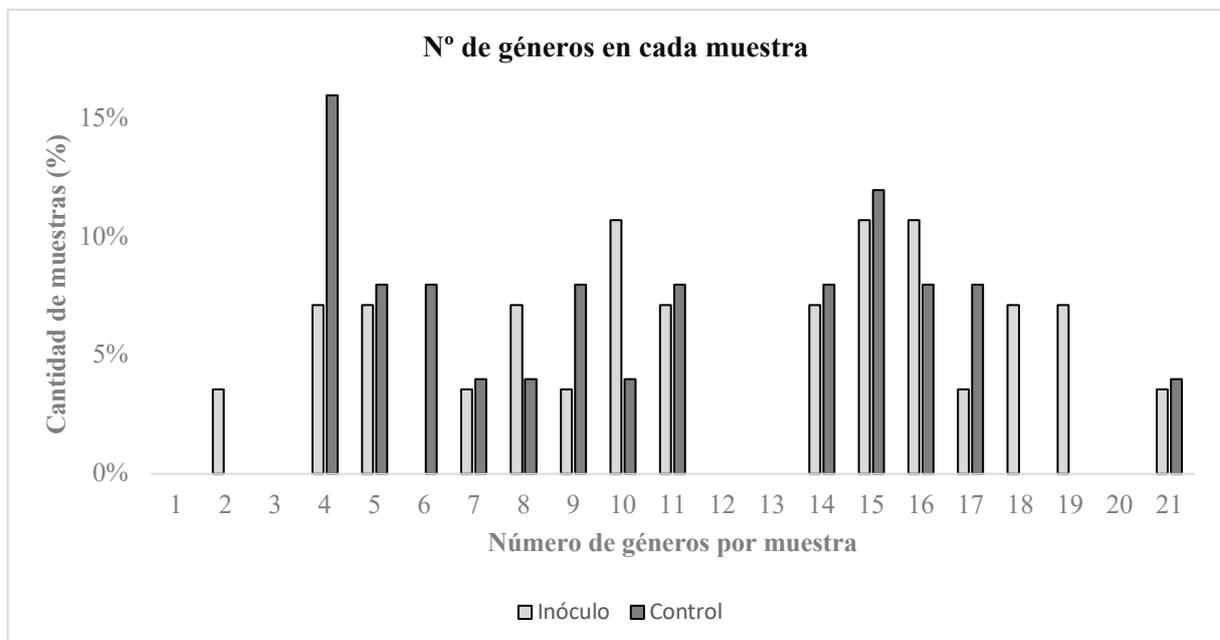


Gráfica R.3.3. Proporción media de los 17 géneros más abundantes en la muestra del interior del conducto radicular (inóculo) y en el control positivo (biofilm crecido *ex vivo* en medio de cultivo sin antibiótico). Los géneros seleccionados tienen una proporción media mayor al 2% en el inóculo. El asterisco indica que los valores comprendidos por el corchete son estadísticamente significativos ($p < 0,05$). Las barras muestran las medias y error estándar.

Cada muestra tiene de media 12 géneros diferentes con una abundancia mayor al 1% en el inóculo y 10 géneros en el biofilm obtenido del control positivo. Además, se observa que, de media, la suma de los 4 géneros más abundantes de cada muestra representa un 72% del total de la muestra en el caso del inóculo y un 77% en el caso del control (gráfica R.3.4.). Existe una gran variabilidad en la diversidad bacteriana entre muestras, se observa un número de géneros en las muestras que oscila entre 2 y 21, con una distribución similar en el inóculo y el biofilm crecido *ex vivo* en medio de cultivo sin antibiótico (gráfica R.3.5). En conjunto, los datos muestran que la composición de las muestras recogidas es claramente polimicrobiana y variable entre muestras, que está dominada por un número limitado de géneros, y que el biofilm crecido en condiciones *in vitro* en el sistema xCELLigence® es similar al del inóculo utilizado, cuando éste se crece durante 8 horas.



Gráfica R.3.4. Gráfica que muestra el porcentaje que de media representa la suma de los 4 géneros más abundantes de cada muestra en el inóculo y en el control de 25 muestras del interior de los conductos radiculares necróticos. Las barras muestran las medias y desviación estándar.



Gráfica R.3.5. Representación gráfica de la cantidad de muestras (en porcentaje) que tienen el mismo número de géneros diferentes con una abundancia mayor al 1%.

4. EFECTO *IN VITRO* DE DIFERENTES ANTIBIÓTICOS

4.1. Patrones de crecimiento

Tras la obtención de los valores de impedancia del sistema RTCA xCelligence® se observan 4 patrones de respuesta del biofilm frente a los diferentes antibióticos:

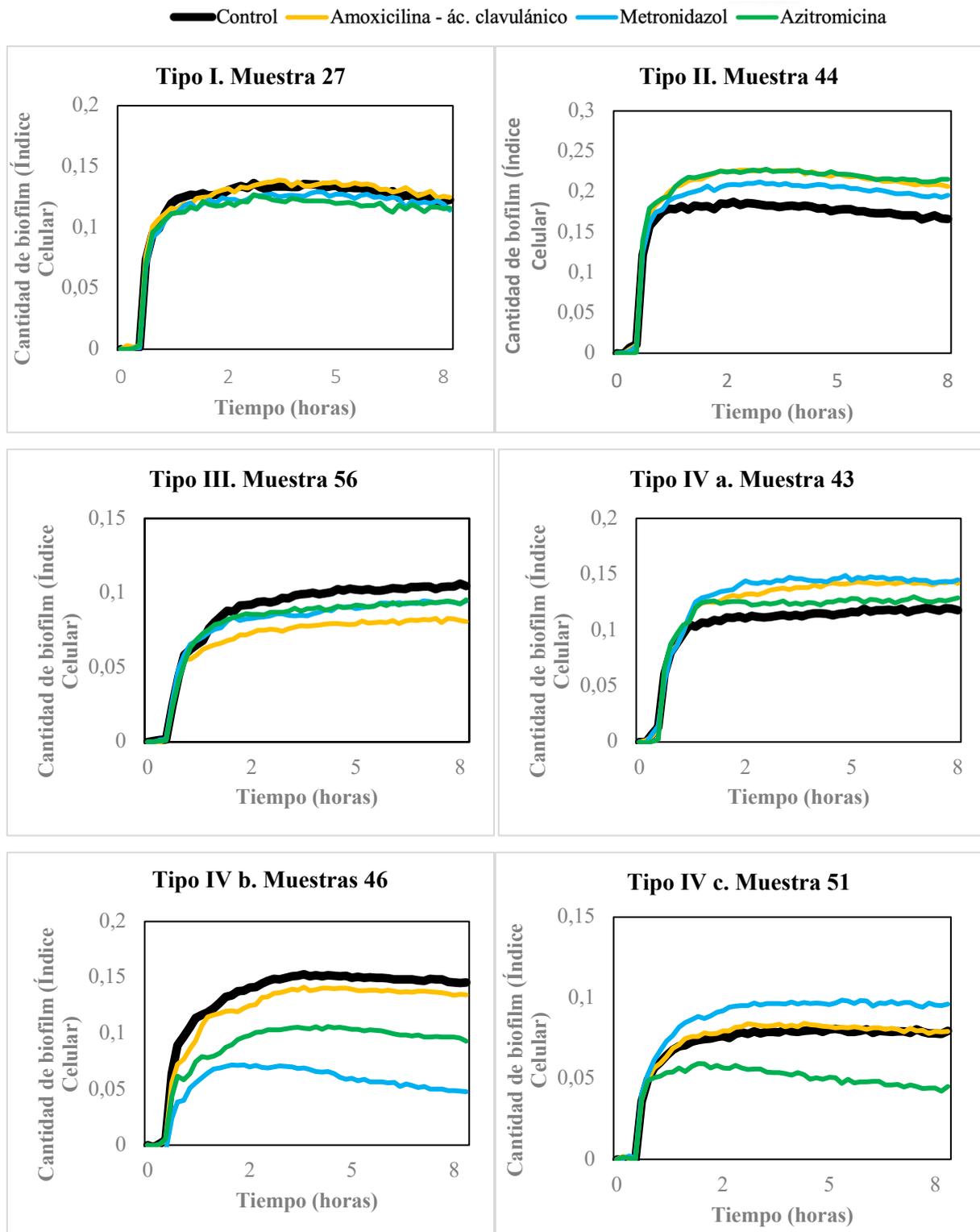
- Ningún antibiótico modifica la curva de crecimiento del biofilm (Tipo I).
- Todos los antibióticos producen inducción en la formación del biofilm (Tipo II).
- Todos los antibióticos producen inhibición en la formación del biofilm (Tipo III).
- Cada antibiótico tiene un efecto diferente sobre la curva de crecimiento del biofilm (Tipo IV). Dentro de este patrón podemos diferenciar:
 - Tipo IVa: uno o dos antibióticos producen inducción del biofilm y el resto no influyen.
 - Tipo IVb: uno o dos antibióticos producen inhibición del biofilm y el resto no influyen.
 - Tipo IVc: uno o dos antibióticos producen inducción del biofilm y uno o dos antibióticos producen inhibición del biofilm.

Se consideró que un antibiótico no produce efecto cuando la inhibición o estimulación es menor al 10%. Cada uno de los patrones queda reflejado en la gráfica R.4.1.1 y tabla R.4.1.1.

Una de las ventajas del sistema de monitorización continua en tiempo real es que el efecto antibiótico puede cuantificarse a distintos puntos del crecimiento del biofilm. En la tabla R.4.1.1, puede verse que el porcentaje de inhibición o inducción se mantiene en valores similares a las 4 y a las 8 horas en todos los patrones de comportamiento del biofilm.

De las 40 muestras incluidas tras el procesado en el RTCA xCelligence®, en 16 se aplicaron 2 antibióticos (amoxicilina – ác. clavulánico y metronidazol) y en 24 se aplicaron 3 antibióticos (amoxicilina – ác. clavulánico, metronidazol y azitromicina).

El patrón de crecimiento de biofilm menos frecuente es el tipo I y el más frecuente el tipo IV. Cuando se aplican 3 antibióticos distintos y no tienen el mismo efecto, lo más frecuente (con un 47% de los casos) es el tipo IVb (inhibición de 1 o 2 antibióticos), seguido del tipo IVc con un 41% (inducción de 1 o 2 antibióticos e inhibición de 1 o 2 antibióticos). Los porcentajes de frecuencia de los diferentes patrones se muestra en la tabla R.4.1.2.



Gráfica R.4.1.1. Efecto *in vitro* de distintos antibióticos sobre el biofilm endodóntico procedente de conductos radiculares necróticos. Se observa las diferentes dinámicas de formación de biofilm, obtenidas a partir de valores de impedancia (Cell Index / Índice Celular) generados en el sistema RTCA xCELLigence®. Las curvas muestran el crecimiento del biofilm en ausencia de antibiótico (control positivo, curva en negro) o presencia de antibiótico: amoxicilina – ác. clavulánico (amarillo), metronidazol (azul), azitromicina (verde). Los paneles muestran ejemplos representativos de cada uno de los 4 patrones encontrados.

		% Inhibición - Inducción					
		4 horas			8 horas		
		Amoxicilina	Metronidazo	Azitromicina	Amoxicilina	Metronidazo	Azitromicina
Tipo I	Muestra 27	3%	-6%	-8%	3%	-3%	-5%
Tipo II	Muestra 44	24%	15%	24%	24%	16%	27%
Tipo III	Muestra 56	-21,4%	-13,9%	-10,3%	-21,9%	-10,5%	-10,2%
	a Muestra 43	22%	29%	9%	20%	21%	8%
Tipo IV	b Muestra 46	-8%	-55%	-31%	-8%	-66%	-34%
	c Muestra 51	5%	22%	-33%	1%	22%	-44%

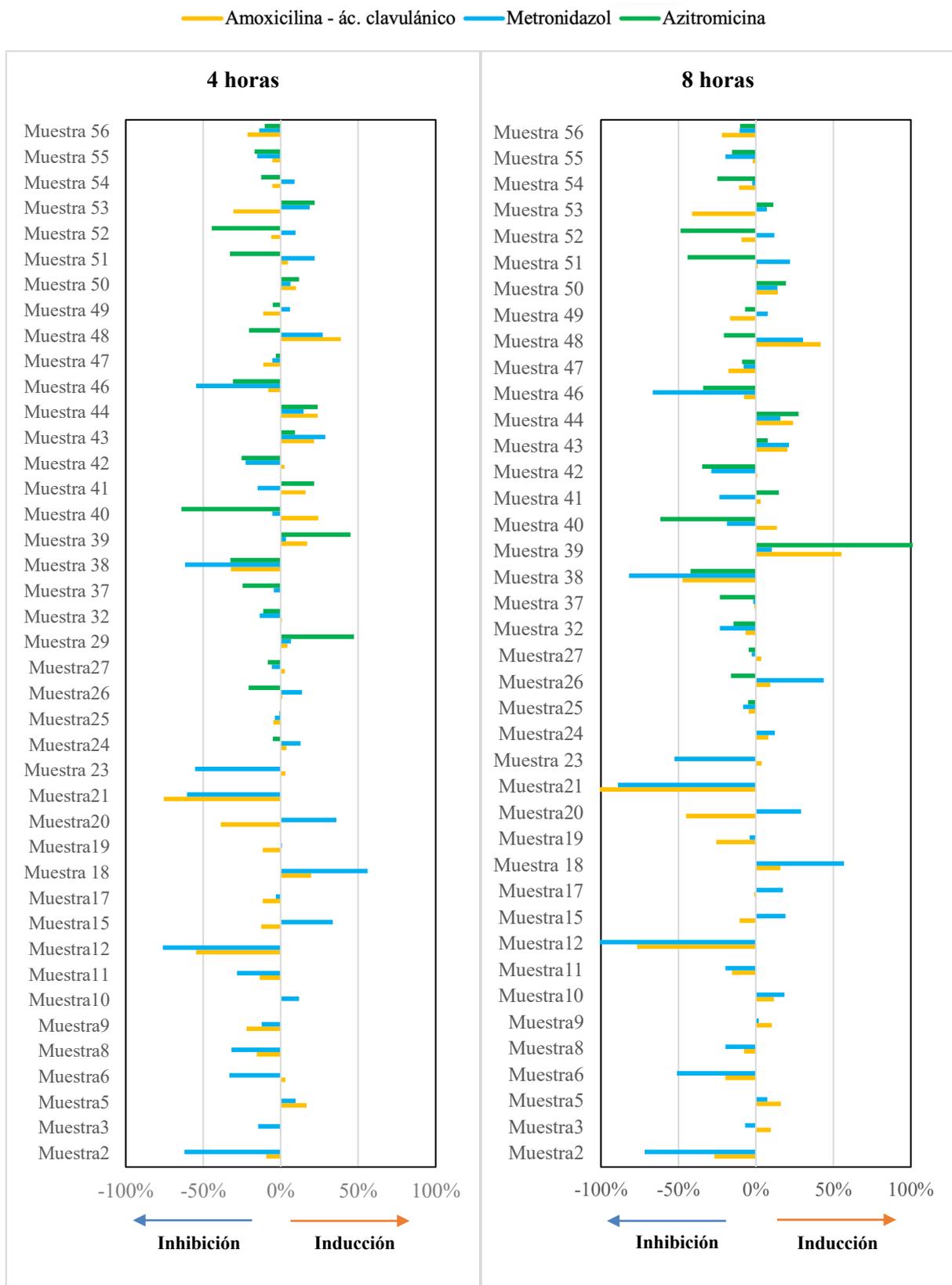
Tabla R.4.1.1. Porcentaje de inhibición (valores negativos) o de inducción (valores positivos), con respecto al control (ausencia de antibiótico), de la formación de biofilm endodóntico en presencia de distintos antibióticos a las 4 y 8 horas de crecimiento in vitro en el sistema RTCA xCELLigence®. El gradiente de intensidad de color se corresponde con la intensidad de inhibición e inducción.

RTCA xCELLigence con 2 antibióticos n=16			
Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV
6% (1)	12% (2)	31% (5)	50% (8)
		a	b
		37,5% (3)	37,5% (3)
			c
			25% (2)

RTCA xCELLigence con 3 antibióticos n=24			
Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV
8% (2)	13% (3)	8% (2)	71% (17)
		a	b
		12% (2)	47% (8)
			c
			41% (7)

Tabla R.4.1.2. Porcentaje de frecuencia de los diferentes patrones de crecimiento de biofilm tras aplicar 2 (amoxicilina – ác. clavulánico y metronidazol) o 3 antibióticos (amoxicilina – ác. clavulánico, metronidazol y azitromicina).

Tras la cuantificación del porcentaje de inhibición o inducción de la formación de biofilm para cada uno de los antibióticos, con respecto al control positivo (ausencia de antibiótico), se observó una gran variabilidad del efecto para todos los antibióticos. El metronidazol fue el antibiótico que consiguió inhibir la formación de biofilm de forma intensa (>50%) en el mayor número de casos (17%), mientras que la azitromicina fue el antibiótico que tuvo un efecto leve – moderado (10-50%) de inhibición en el mayor número de muestras (48%). En cuanto a la inducción del biofilm, el metronidazol ha sido el que ha provocado una inducción leve (10-25%) en el mayor número de casos (24%), seguido por la amoxicilina – ác. clavulánico (20%). Respecto a la inducción moderada – severa (>25%) no se observa diferencia entre los diferentes antibióticos (gráficas R.4.1.2 y R.4.1.3). Además, en la gráfica R.4.1.2 se observa que no existen prácticamente diferencias entre los valores de inhibición y estimulación de los diferentes antibióticos sobre la formación de biofilm a las 4 y 8 horas.



Gráfica R.4.1.2. Representación gráfica del porcentaje de inhibición o de inducción de la formación *in vitro* de biofilm endodóntico, con respecto al control sin antibiótico, en presencia de distintos antibióticos a las 4 y 8 horas de crecimiento.

4.2 Composición bacteriana según el patrón de crecimiento del biofilm

Tras comparar la composición bacteriana de las 2 muestras que se engloban en el patrón de crecimiento tipo I, se observa que con los 3 antibióticos testados existe una gran variabilidad. En la muestra 25 hay tres géneros predominantes: *Parvimonas*, *Peptostreptococcus* y *Phocaeicola*. En este caso, *Parvimonas* y *Peptostreptococcus* ven reducida su abundancia tras la aplicación de amoxicilina - ác. clavulánico, metronidazol y azitromicina. El género *Phocaeicola* es el único entre los más abundantes que se encuentra en las dos muestras con patrón de crecimiento tipo I. Sin embargo, tras la aplicación de los diferentes antibióticos, *Phocaeicola* aumenta su proporción en la muestra 25 mientras que disminuye en la muestra 27. El género más abundante de la muestra 27 es *Pyramidobacter*, su proporción no varía tras la aplicación de amoxicilina - ác. clavulánico, pero sí disminuye tras la aplicación de metronidazol y azitromicina. Los géneros de ambas muestras se encuentran representados en la gráfica R.4.2.1.

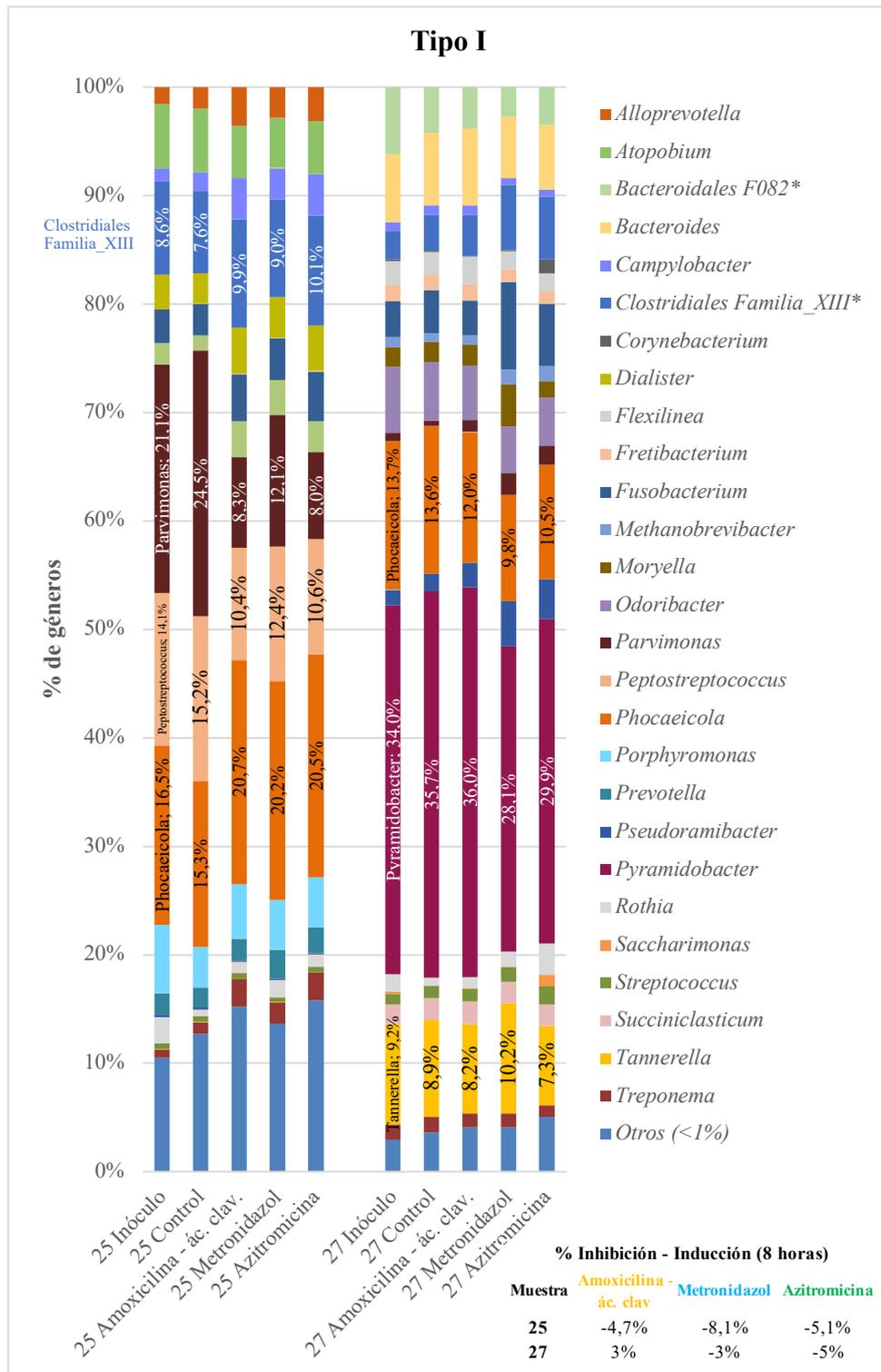
Tras secuenciar 2 de las 3 muestras con patrón de crecimiento tipo II se observa que también existe una gran variabilidad respecto a la abundancia de los géneros encontrados. En la muestra 39 encontramos como géneros más abundantes *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Rothia* y *Streptococcus*. A pesar de que, tras la aplicación de los 3 antibióticos el biofilm resultante en todos los casos sufrió una inducción respecto al control, el efecto de estos antibióticos sobre los géneros más abundantes es diferente. La amoxicilina - ác. clavulánico y la azitromicina provocaron la inhibición de *Corynebacterium* y *Streptococcus*, mientras que el metronidazol estimuló el crecimiento de ambos géneros. El género *Pseudomonas* fue estimulado por amoxicilina - ác. clavulánico y azitromicina, mientras que fue inhibido por metronidazol. Por último, en el caso de *Rothia* los tres antibióticos inhibieron su crecimiento. En la muestra 44 se observa que los géneros más abundantes difieren de los de la muestra 39. En este caso, los géneros más abundantes son modificados de forma similar por la acción de los tres antibióticos. *Prevotella* y *Aggregatibacter* mantienen sus proporciones tras la acción de los antibióticos, mientras que *Porphyromonas* y *Phocaeicola* disminuyen su proporción (gráfica R.4.2.2).

Tras el estudio de las 2 muestras que pertenecen al patrón de crecimiento tipo III se observa una gran variabilidad de abundancias. Sin embargo, ambas muestras presentan de forma abundante *Streptococcus* y *Capnocytophaga*. En el caso del *Streptococcus*, disminuye tanto en la muestra 38 como en la 56 tras la aplicación de los tres antibióticos, mientras que *Capnocytophaga* disminuye en la muestra 38 y aumenta su proporción en la 56 tras la acción

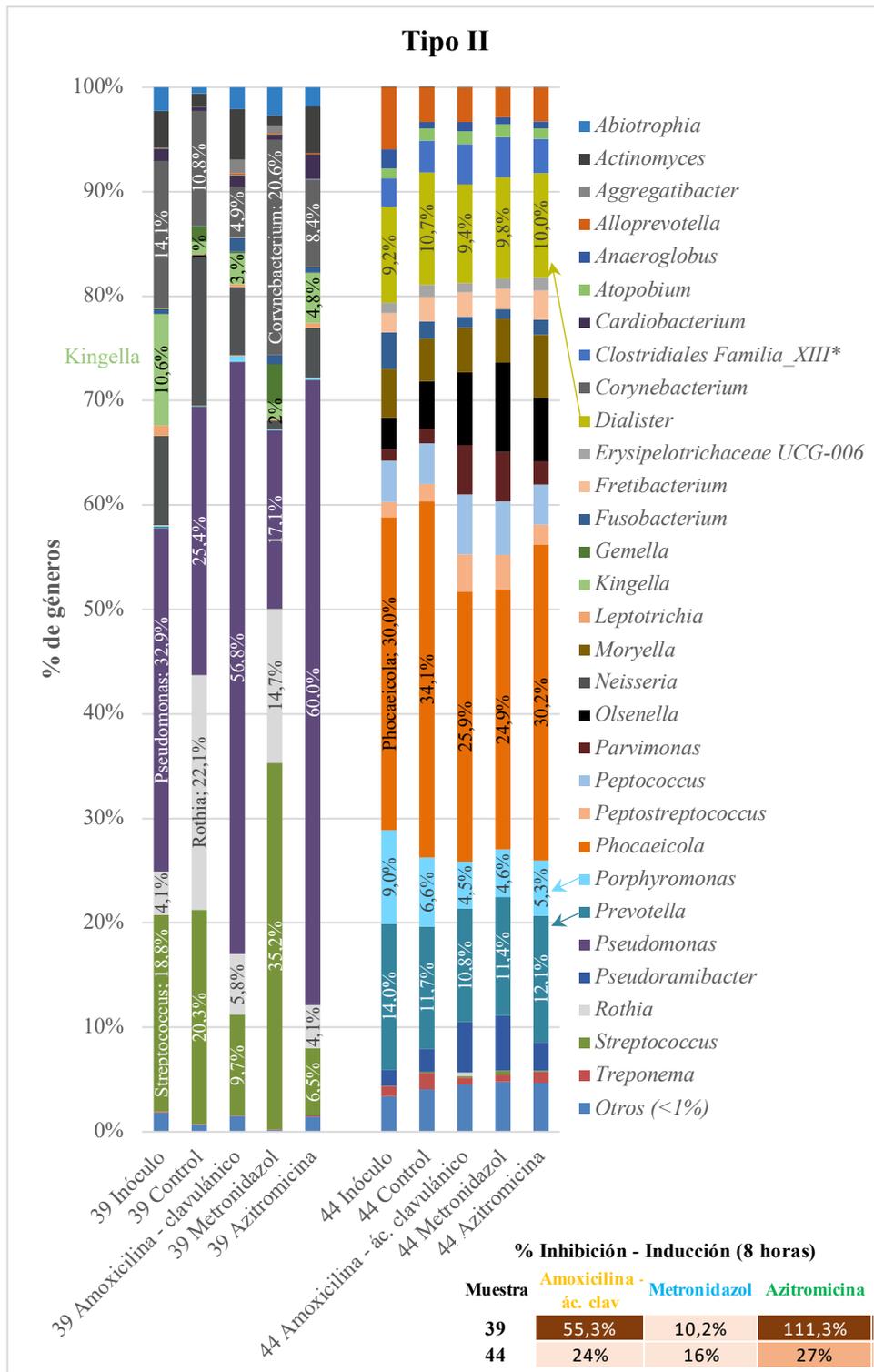
de los antibióticos. *Veillonella* y *Pseudomonas* son los otros géneros más predominantes de la muestra 38. El género *Veillonella* aumenta su abundancia tras el uso de amoxicilina - ác. clavulánico y azitromicina, en cambio el metronidazol no influye en su abundancia. En el caso de las *Pseudomonas*, son estimuladas por la amoxicilina – ác. clavulánico y el metronidazol, mientras que la azitromicina no produce cambios en su abundancia. Por último, se observa que el género más abundante de la muestra 56 es el *Capnocytophaga* y todos los antibióticos testados aumentan su proporción, aunque con una intensidad variable (gráfica R.4.2.3).

Respecto a las muestras con patrón de crecimiento tipo IVa tras la aplicación de los antibióticos se observa que ambas muestras presentan como géneros predominantes *Phocaeicola* y *Tannerella*. Además, en ninguno de los casos tuvieron lugar grandes cambios en la composición bacteriana debido a la acción de los antibióticos. Cabe destacar el aumento de *Parvimonas* y *Pseudoramibacter* en la muestra 24 tras la aplicación de azitromicina (gráfica R.4.2.4).

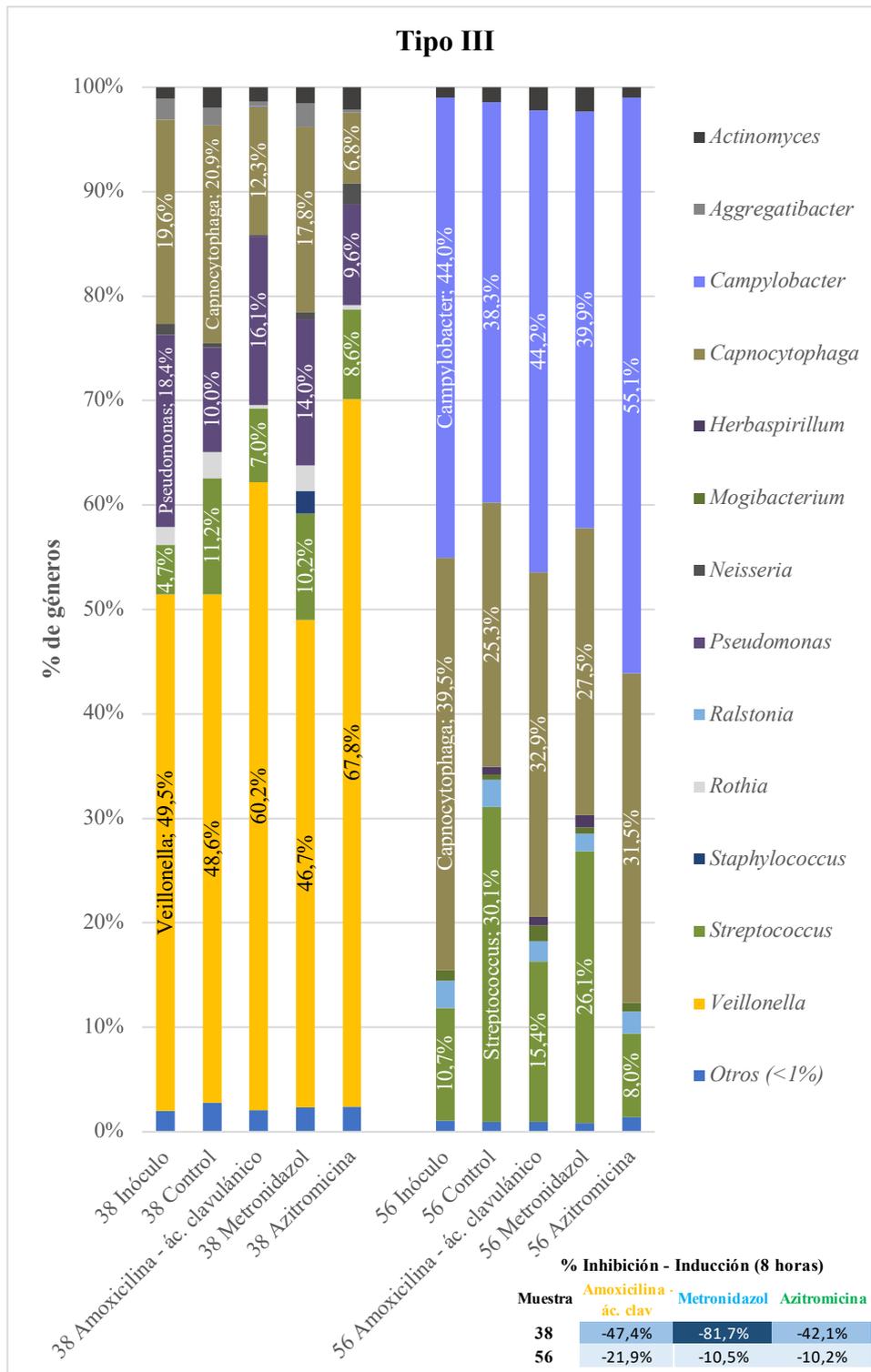
La mayoría de las muestras analizadas siguieron un patrón de crecimiento tipo IV, especialmente tipo IVb y IVc. En las gráficas R.4.2.5 y R.4.2.6 se muestra la composición bacteriana de 3 muestras de ambos tipos. Se observa una alta variabilidad de la composición bacteriana entre las 6 muestras y un efecto limitado de los antibióticos sobre la abundancia de los géneros más predominantes. Sin embargo, *Phocaeicola* es el género predominante en las muestras 32 y 46 (tipo IVb). Por último, cabe destacar que la amoxicilina – ác. clavulánico y la azitromicina provocan inhibición de *Streptococcus* y estimulación de *Veillonella* en la muestra 48 (tipo IVc), no pudiendo atribuir este hecho al comportamiento del biofilm tras la aplicación de los antibióticos, puesto que la amoxicilina – ác. clavulánico y el metronidazol indujeron la formación de biofilm, mientras que la azitromicina lo inhibió.



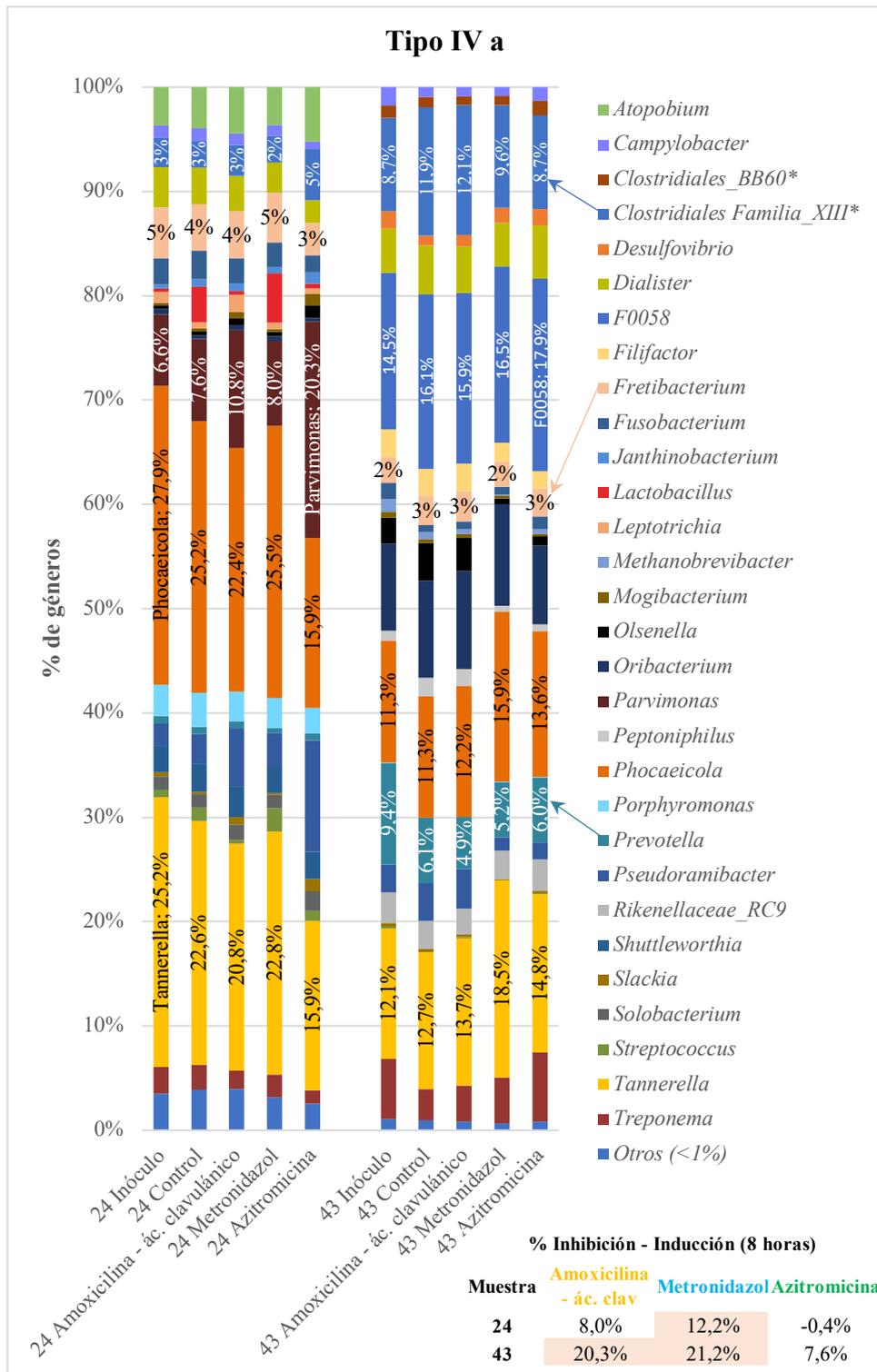
Gráfica R.4.2.1. Representación gráfica del porcentaje de géneros presentes en las muestras con patrón de crecimiento tipo I tras la aplicación de amoxicilina - ác. clavulánico, metronidazol y azitromicina. Se muestra en la gráfica el nombre de los géneros más abundantes de cada muestra. Además, en la esquina inferior derecha de la gráfica se muestra el porcentaje de inhibición o inducción de biofilm en ambas muestras por cada uno de los antibióticos. Los asteriscos indican que no se ha podido asignar a nivel de género, por lo que se indica el nivel filogenético anterior.



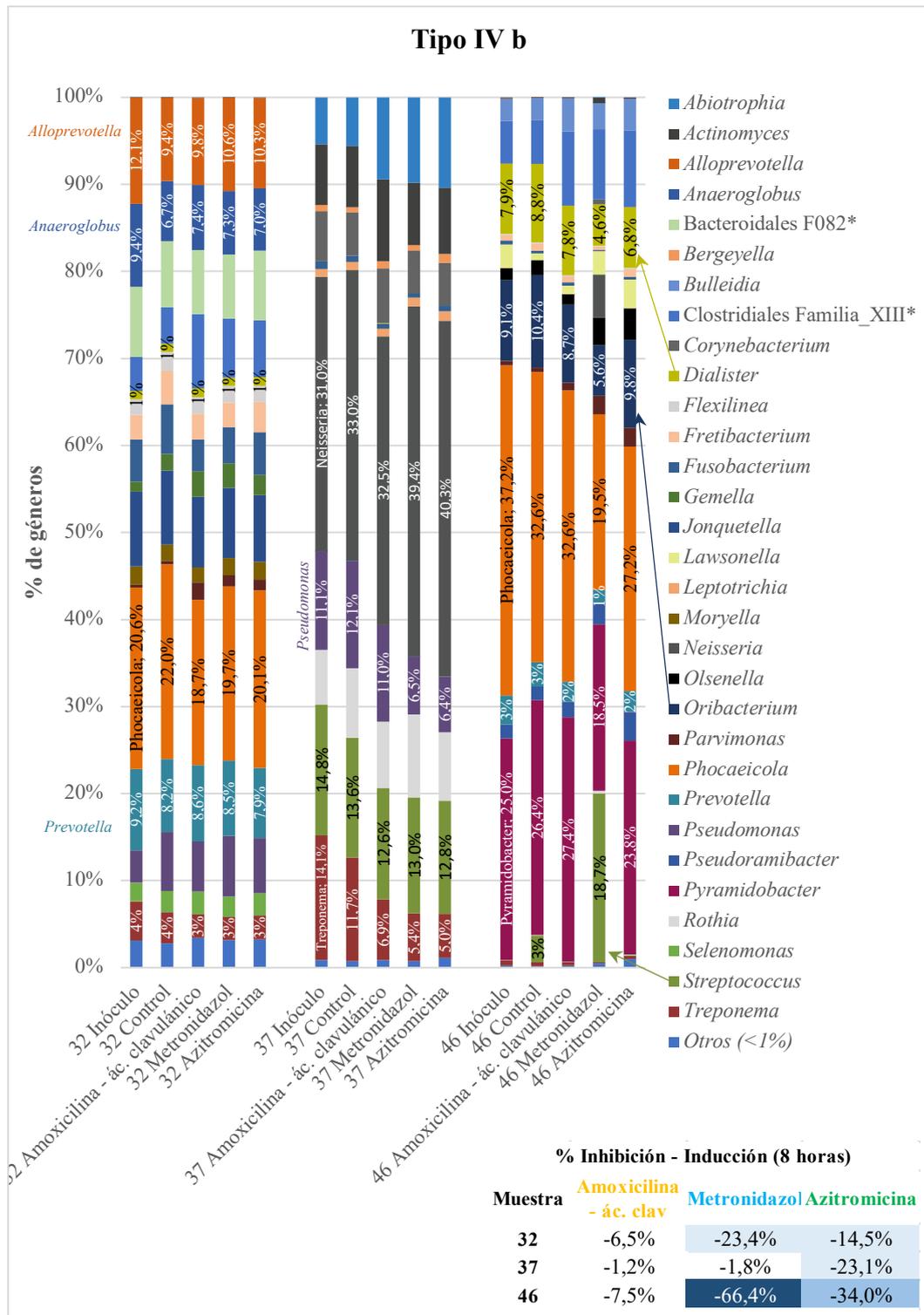
Gráfica R.4.2.2. Representación gráfica del porcentaje de géneros presentes en las muestras con patrón de crecimiento tipo II tras la aplicación de amoxicilina - ác. clavulánico, metronidazol y azitromicina. Se muestra en la gráfica el nombre de los géneros más abundantes de cada muestra. Además, en la esquina inferior derecha de la gráfica se muestra el porcentaje de inhibición o inducción de biofilm en ambas muestras por cada uno de los antibióticos. El asterisco indica que no se ha podido asignar a nivel de género, por lo que se indica el nivel filogenético anterior.



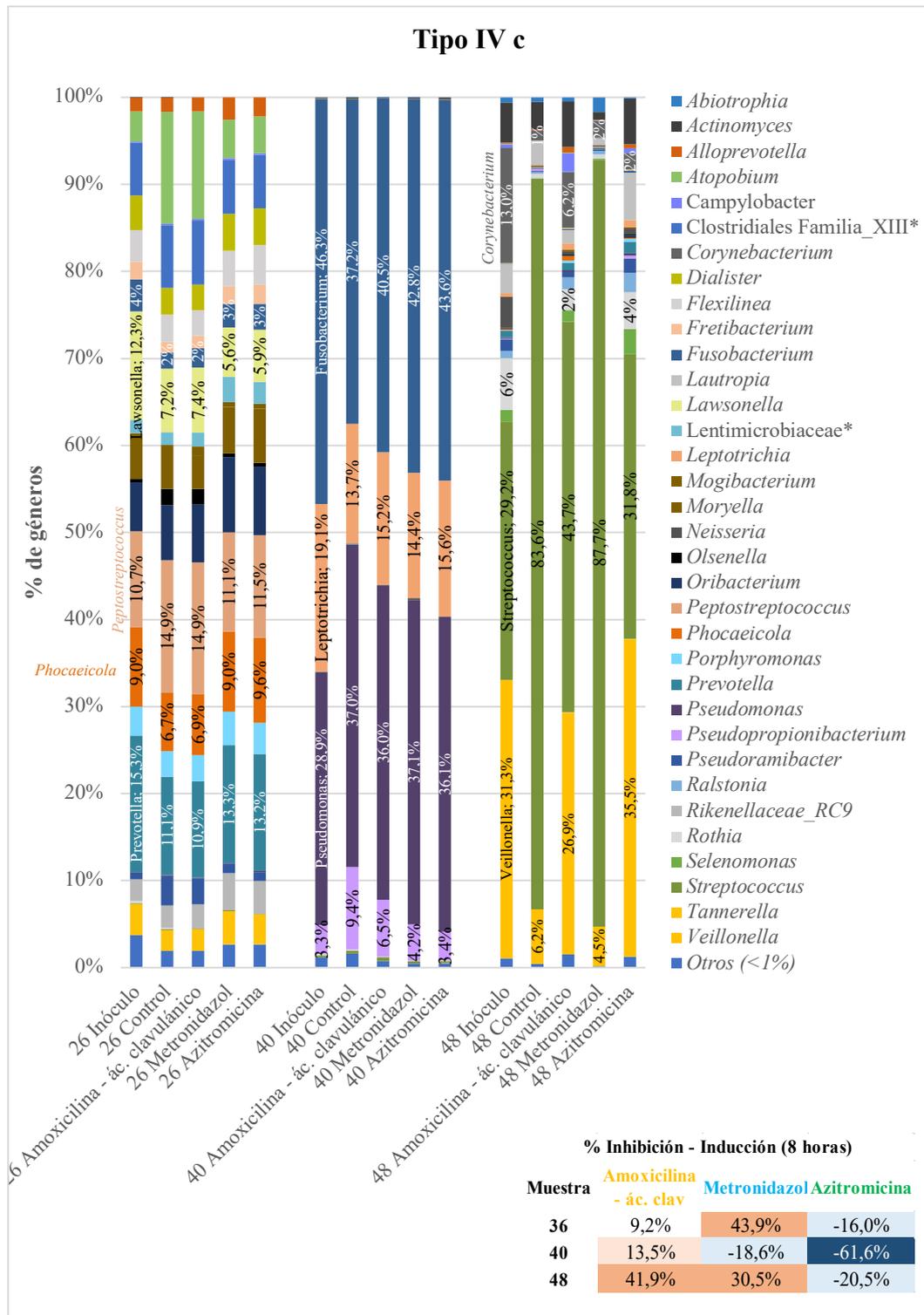
Gráfica R.4.2.3. Representación gráfica del porcentaje de géneros presentes en las muestras con patrón de crecimiento tipo III tras la aplicación de amoxicilina - ác. clavulánico, metronidazol y azitromicina. Se muestra en la gráfica el nombre de los géneros más abundantes de cada muestra. Además, en la esquina inferior derecha de la gráfica se muestra el porcentaje de inhibición o inducción de biofilm en ambas muestras por cada uno de los antibióticos.



Gráfica R.4.2.4. Representación gráfica del porcentaje de géneros presentes en las muestras con patrón de crecimiento tipo IVa tras la aplicación de amoxicilina - ác. clavulánico, metronidazol y azitromicina. Se muestra en la gráfica el nombre de los géneros más abundantes de cada muestra. Además, en la esquina inferior derecha de la gráfica se muestra el porcentaje de inhibición o inducción de biofilm en ambas muestras por cada uno de los antibióticos.



Gráfica R.4.2.5. Representación gráfica del porcentaje de géneros presentes en tres muestras con patrón de crecimiento tipo IVb tras la aplicación de amoxicilina - ác. clavulánico, metronidazol y azitromicina. Se muestra en la gráfica el nombre de los géneros más abundantes de cada muestra. Además, en la esquina inferior derecha de la gráfica se muestra el porcentaje de inhibición o inducción de biofilm en las muestras por cada uno de los antibióticos.

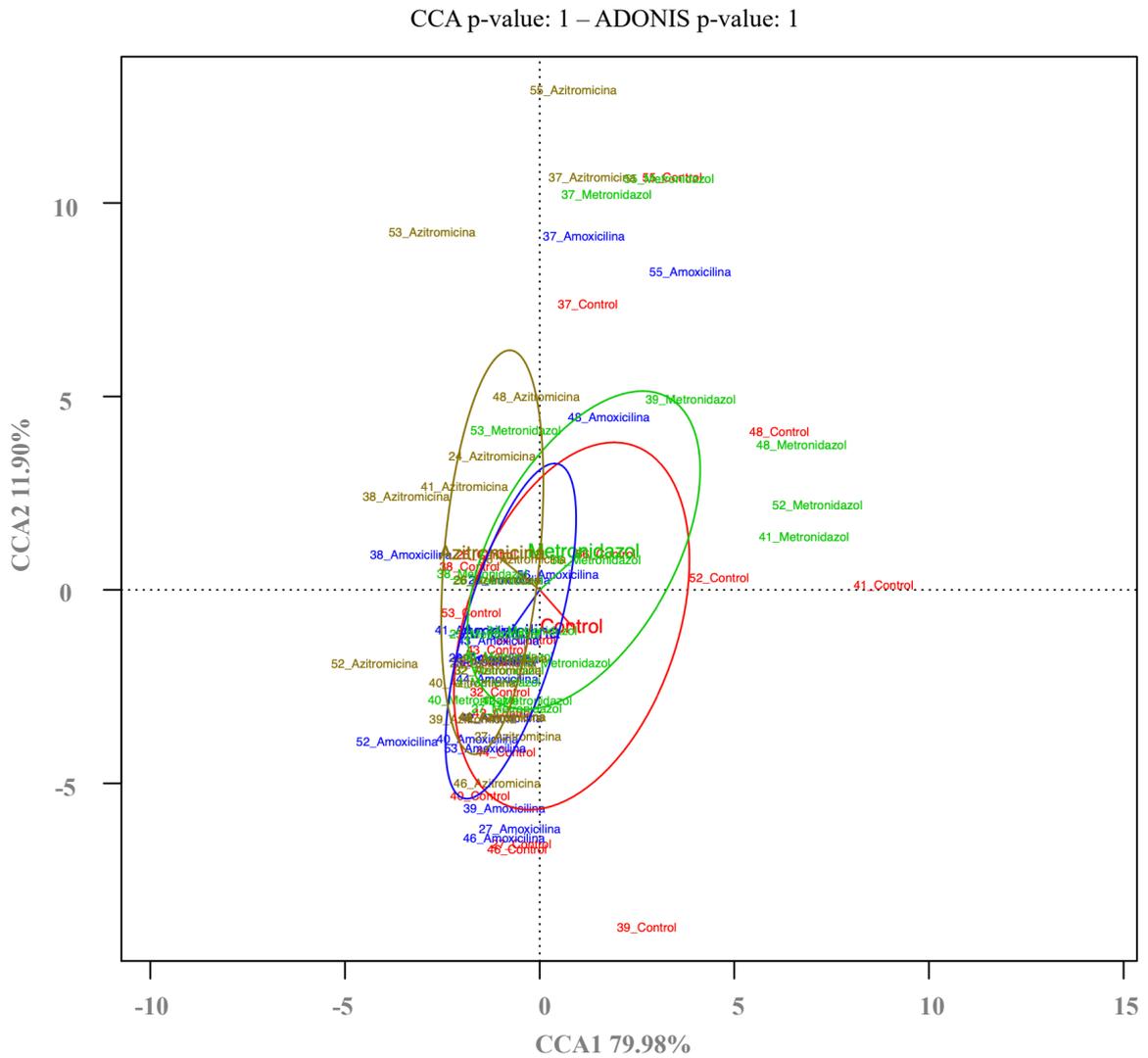


Gráfica R.4.2.6. Representación gráfica del porcentaje de géneros presentes en tres muestras con patrón de crecimiento tipo IVc tras la aplicación de amoxicilina - ác. clavulánico, metronidazol y azitromicina. Se muestra en la gráfica el nombre de los géneros más abundantes de cada muestra. Además, en la esquina inferior derecha de la gráfica se muestra el porcentaje de inhibición o inducción de biofilm en las muestras por cada uno de los antibióticos.

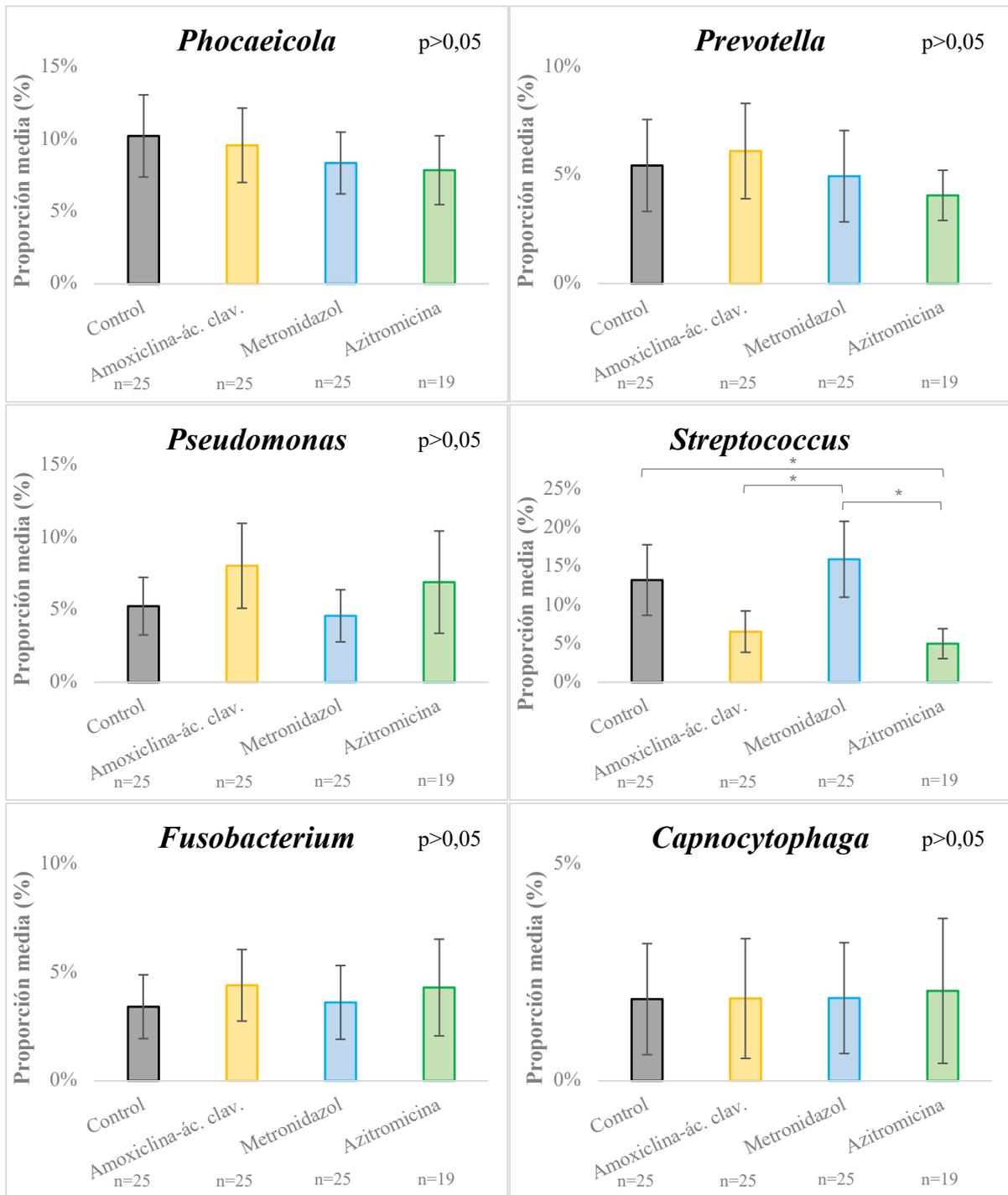
4.3. Efecto antibiótico sobre la composición bacteriana

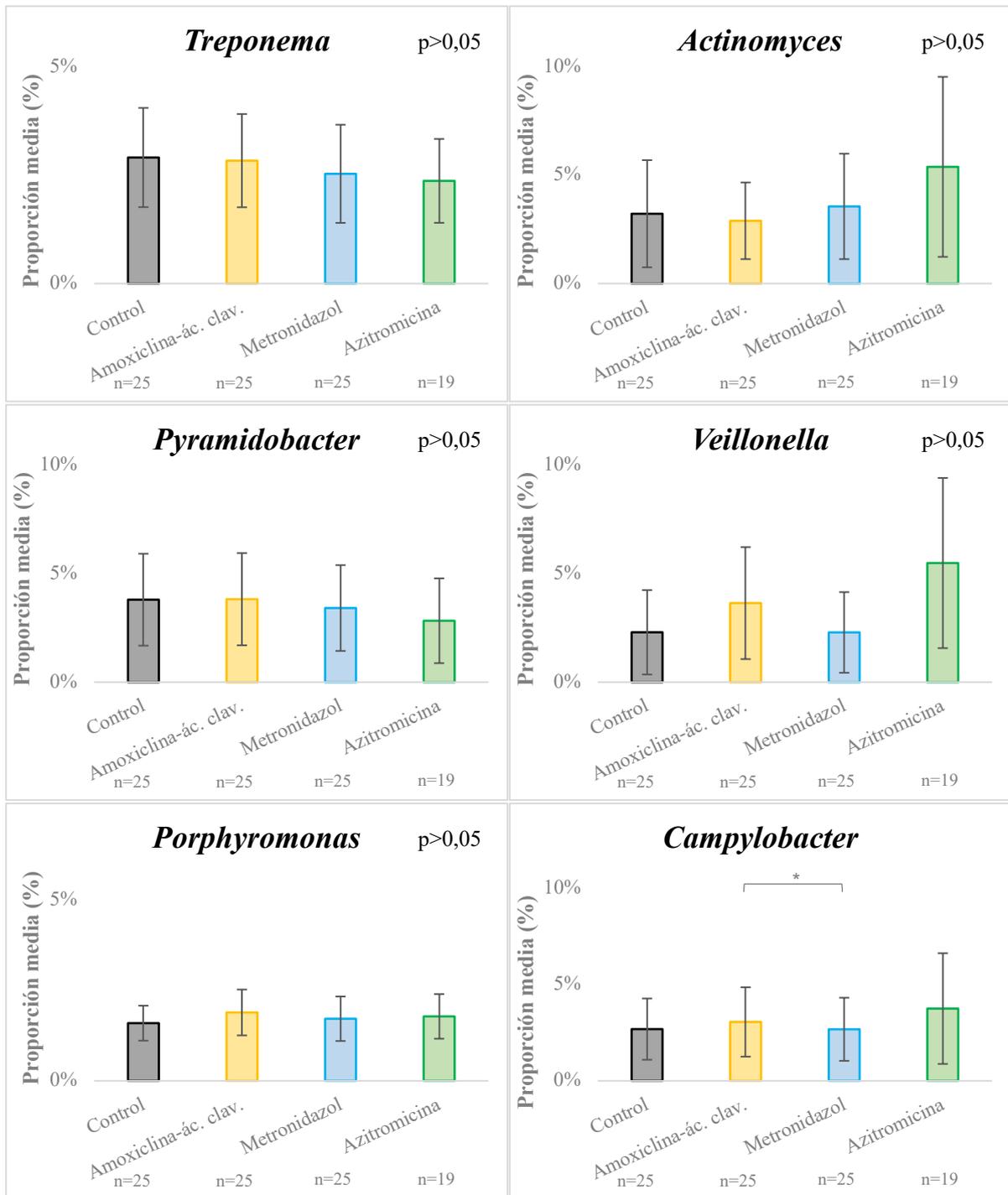
Se ha llevado a cabo un análisis canónico de correspondencia (CCA) de las 19 muestras de pacientes de las cuales se obtuvo control positivo y biofilm endodóntico tras la aplicación de amoxicilina – ác. clavulánico, metronidazol y azitromicina. Se observa que cada paciente presenta una composición bacteriana distinta al resto ($p=0,001$). Además, cada una de las muestras de un mismo paciente, tras la aplicación de los diferentes antibióticos, son muy similares, indicando que, aunque algunas especies puedan variar en sus porcentajes relativos, los antibióticos testados no influyen en la estructura general de las poblaciones bacterianas (gráfica R.4.3.1). Tras realizar el CCA de las 19 muestras agrupándolas por el antibiótico aplicado, se demuestra que, de forma general, no existe diferencia estadísticamente significativa entre la composición bacteriana de las muestras tratadas con los diferentes antibióticos ni con el control positivo (gráfica R.4.3.2).

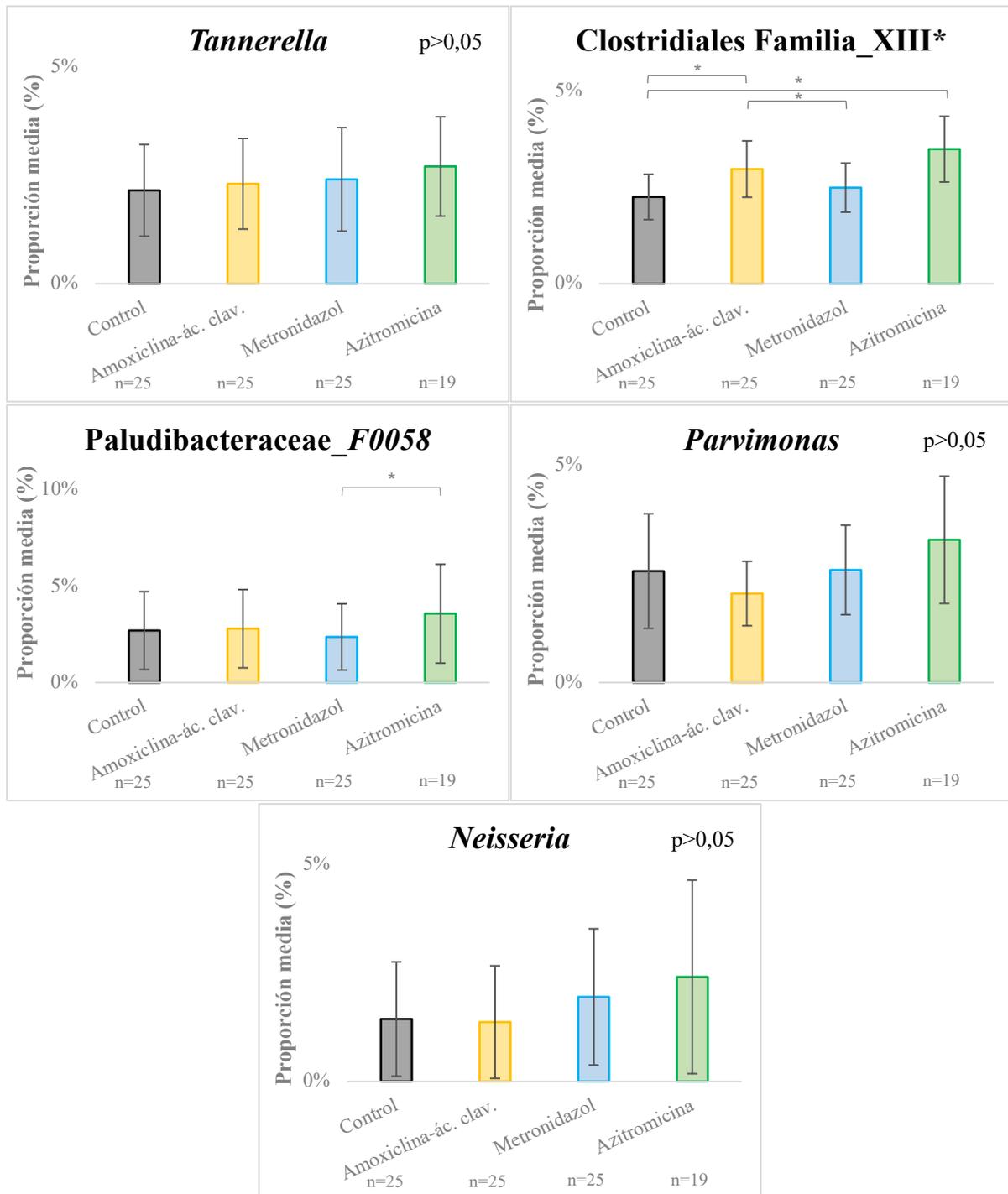
Para analizar el efecto de los diferentes antibióticos sobre el biofilm, se comparó mediante el test de Wilcoxon la proporción media de los diferentes géneros en el control positivo y en el biofilm resultante tras la aplicación de los diferentes antibióticos en el sistema *in vitro* RTCA xCELLigence®. Se seleccionaron los 17 géneros con una abundancia media en el inóculo mayor al 2%. Tras el análisis de los resultados se observa que la proporción media en el control positivo de la mayoría de los géneros seleccionados, no se diferencia de la obtenida tras la aplicación de amoxicilina – ác. clavulánico, metronidazol o azitromicina. En cambio, se ha detectado una mayor cantidad, de forma significativa ($p<0,05$), de *Streptococcus* en el control positivo en comparación con el biofilm obtenido tras la aplicación de azitromicina. Por último, se observa mayor abundancia de Clostridiales Familia_XIII (no se puede asignar a nivel de género) tras la aplicación de amoxicilina – ác. clavulánico o azitromicina en comparación con el control positivo ($p<0,05$). Estos resultados se muestran en la gráfica R.4.3.3.



Gráfica R.4.3.2. Representación gráfica del análisis canónico de correspondencia (CCA), en función del tratamiento aplicado: control positivo, amoxicilina - ác.clavulánico, metronidazol o azitromicina. Este análisis estadístico ha sido llevado a cabo sobre las 19 muestras de pacientes de las cuales se obtuvo crecimiento *ex vivo* de la muestra del interior de los conductos radiculares en el control positivo y tras la aplicación de los 3 antibióticos. Cada muestra ocupa una posición en el espacio en función de su composición bacteriana, de forma que las muestras con mayor similitud en su composición tienden a agruparse o solaparse.



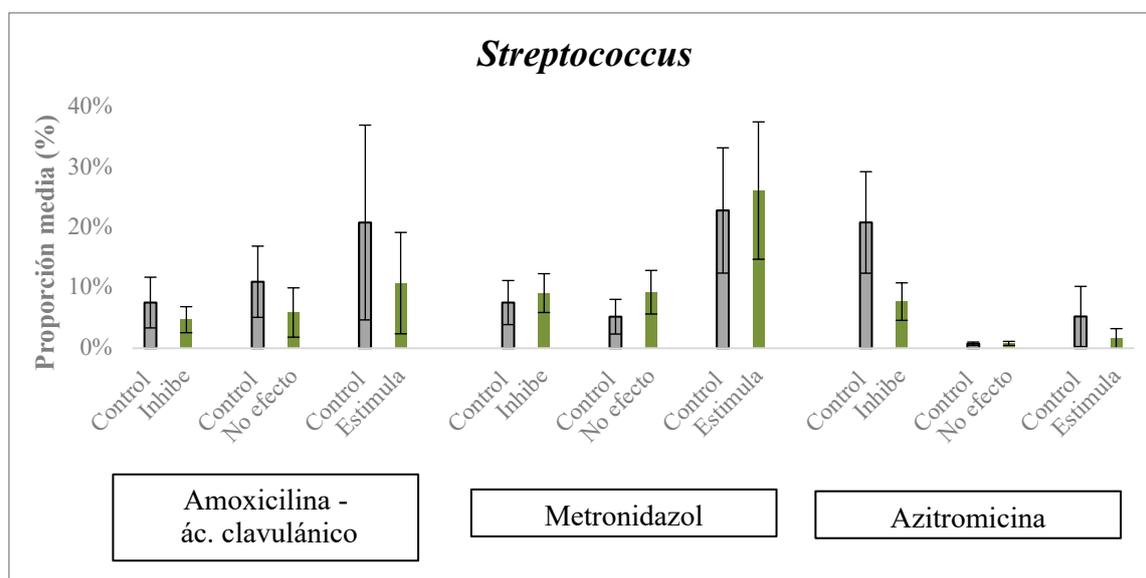




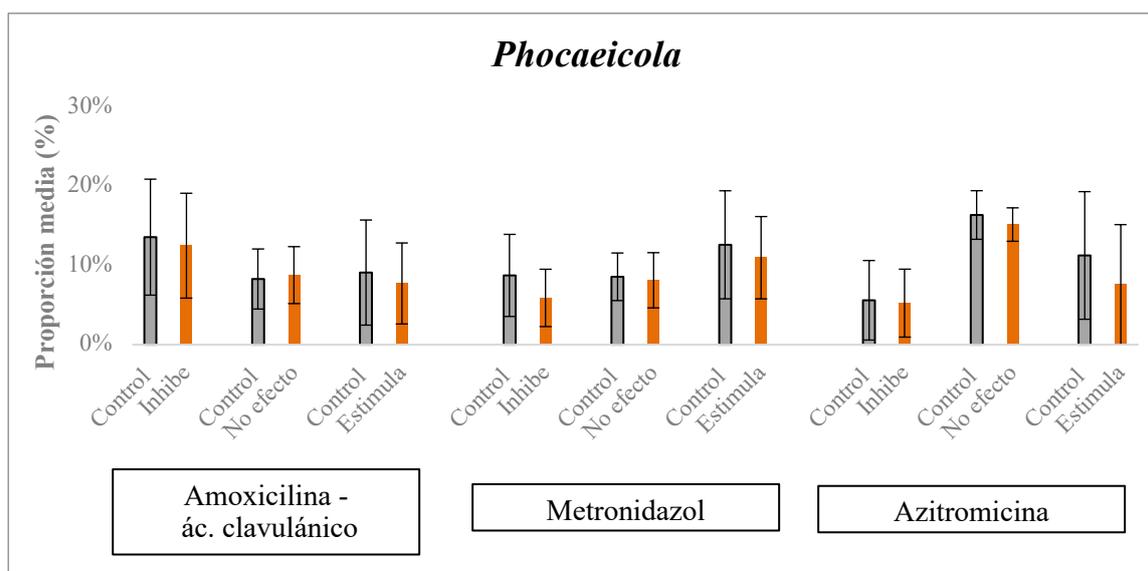
Gráfica R.4.3.3. Proporción media de 17 géneros en el biofilm obtenido del control positivo y tras la aplicación de amoxicilina – ácido clavulánico, metronidazol o azitromicina. Los géneros seleccionados tienen una abundancia media mayor al 2% en el inóculo. Los valores comprendidos por el corchete y con asterisco son estadísticamente significativos ($p < 0,05$). Los datos muestran la media y error estándar. Las gráficas se encuentran ordenadas de mayor a menor proporción media de cada género en el inóculo.

Se ha analizado el efecto de cada uno de los antibióticos sobre la composición bacteriana en función de si ese antibiótico ha inhibido, estimulado o no ha tenido efecto sobre la formación de biofilm en el sistema *in vitro* RTCA xCelligence®. En general se observa que las proporciones de los géneros más abundantes son similares en el biofilm resultante del control positivo y el obtenido tras la aplicación de los diferentes antibióticos, independientemente del efecto del antibiótico sobre el crecimiento del biofilm. Sin embargo, se muestra que el efecto de la amoxicilina – ác. clavulánico y la azitromicina provoca una disminución de la abundancia media de *Streptococcus* cuando hubo inhibición, estimulación o estos antibióticos no influyeron en la formación del biofilm. Además, en todos los casos el metronidazol produjo un aumento de la abundancia media de *Streptococcus* (gráfica R.4.3.4).

Finalmente, *Phocaeicola* es uno de los géneros más abundantes y se encuentra habitualmente entre los 4 géneros más frecuentes de cada muestra. Sin embargo, su abundancia media se mantiene estable respecto al control independientemente del antibiótico y del efecto del mismo sobre la formación de biofilm. Las variaciones de abundancia media más acentuadas tienen lugar cuando el metronidazol inhibe la formación de biofilm y cuando la azitromicina estimula la formación de biofilm, siendo en ambos casos la disminución de *Phocaeicola* un 32% (gráfica R.4.3.5).



Gráfica R.4.3.4. Los datos muestran la media de las proporciones relativas sobre el total de *Streptococcus*, en el control positivo y tras la aplicación de los 3 antibióticos testados, en función de si el antibiótico produjo inhibición, estimulación o no tuvo efecto sobre la formación del biofilm en el sistema RTCA xCelligence®. Las barras muestran la media y el error estándar.



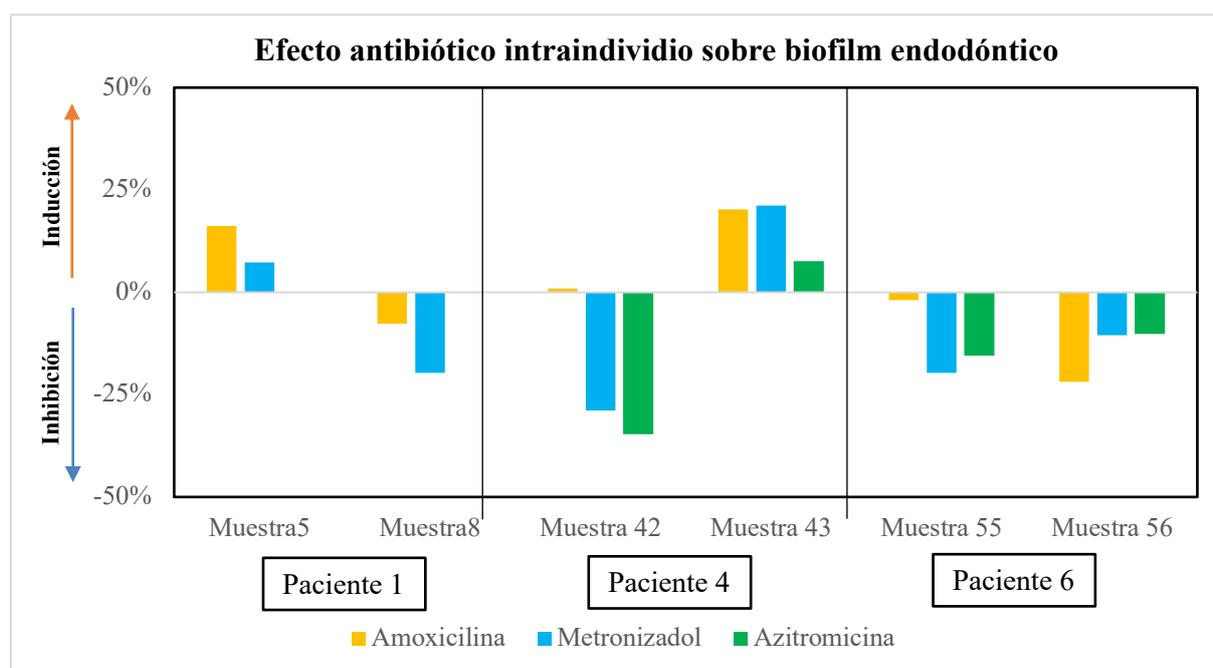
Gráfica R.4.3.5. Los datos muestran la media de las proporciones relativas sobre el total de *Phocaeicola*, en el control positivo y tras la aplicación de los 3 antibióticos testados, en función de si el antibiótico produjo inhibición, estimulación o no tuvo efecto sobre la formación del biofilm en el sistema RTCA xCelligence®. Las barras muestran la media y el error estándar.

4.4. Efecto antibiótico intraindividuo sobre la formación de biofilm

Hubo 6 pacientes de los que se obtuvo muestra de 2 dientes diferentes. En 3 de estos pacientes hubo una muestra en la que no se consiguió suficiente cantidad para formar biofilm (tabla R.4.4.1). Se puede observar que los diferentes antibióticos influyen de manera distinta en los diferentes dientes de un mismo paciente. Así, por ejemplo, en el paciente n° 1 la amoxicilina – ác. clavulánico y el metronidazol indujeron la formación de biofilm en la muestra n° 5 procedente de un 2.4, mientras que la amoxicilina – ác. clavulánico y el metronidazol inhibieron la formación de biofilm en la muestra procedente del diente 2.5. De forma similar ocurrió en el paciente n° 4, en el que en muestras procedentes de dientes contiguos (4.2 y 4.3) los antibióticos testados influyen de manera diferente sobre la formación del biofilm en cada una de ellas. En cambio, en el paciente n° 6 tanto el metronidazol como la azitromicina produjeron una inhibición similar en la formación del biofilm en ambas muestras (3.1 y 4.1), mientras que la amoxicilina – ác. clavulánico en la muestra n° 55 (3.1) no tuvo efecto perceptible, pero en la n° 56 (4.1) produjo una inhibición del 22% (gráfica R.4.4.1).

	N° Muestra	Diente	Área Radiolúcida	Crecimiento biofilm	Amoxicilina - Clavulánico			Metronidazol	Azitromicina
Paciente 1	5	24	No	Sí	16%	7%	-	-	
	8	25	No	Sí	-20%	-51%	-	-	
Paciente 2	31	11	Sí	No	-	-	-	-	
	32	21	No	Sí	-7%	-23%	-14%	-	
Paciente 3	36	32	No	No	-	-	-	-	
	37	42	Sí	Sí	-1%	-2%	-23%	-	
Paciente 4	42	31	Sí	Sí	1%	-29%	-35%	-	
	43	31	Sí	Sí	20%	21%	8%	-	
Paciente 5	44	14	Sí	Sí	24%	16%	27%	-	
	45	34	Sí	No	-	-	-	-	
Paciente 6	55	31	Sí	Sí	-2%	-20%	-15%	-	
	56	41	Sí	Sí	-22%	-11%	-10%	-	

Tabla R.4.4.1. Datos clínicos y porcentaje de inhibición o inducción de la formación de biofilm *in vitro* de 6 pacientes de los cuales se obtuvo muestra de 2 dientes necróticos diferentes. La intensidad de color en las diferentes casillas se correlaciona con la intensidad de inhibición (tonos azules) o estimulación (tonos naranjas).



Gráfica R.4.4.1. Representación gráfica del porcentaje de inhibición o de inducción del biofilm endodóntico, en presencia de distintos antibióticos a las 8 horas de crecimiento *in vitro*, generado a partir de las 2 muestras obtenidas de cada uno de los pacientes 1, 4 y 6.

4.5. Efecto antibiótico intraindividuo sobre la composición bacteriana

Se ha podido estudiar el efecto de los antibióticos sobre muestras de dientes diferentes del mismo paciente en los pacientes número 4 (muestra 42 y 43) y 6 (muestra 55 y 56). En ambos pacientes hubo crecimiento de biofilm en el sistema RTCA xCelligence® y el ensayo se paró a las 8 horas (descartando por tanto el paciente número 1 porque el ensayo se paró a las 16 horas y la composición puede verse alterada puesto que, se encuentra en la fase de crecimiento de declive).

En el **paciente 4** se observa cómo los diferentes antibióticos testados varían levemente las concentraciones de los diferentes géneros, de tal forma que las proporciones de abundancia se mantienen, con ligeras variaciones en ambas muestras (42 y 43). Las abundancias de los diferentes géneros y los porcentajes de variación se muestran en la gráfica R.4.5.1 y en la tabla R.4.5.1. Tras llevar a cabo un análisis CCA (gráfica R.4.3.1), se observa que la composición bacteriana de ambas muestras control no se solapan, y que dentro de cada una de ellas, el tratamiento antibiótico no altera la estructura poblacional, observándose solamente variaciones en algunos organismos.

Concretamente en la muestra 42, la amoxicilina – ác. clavulánico no altera las proporciones de los géneros en comparación al control (muestra de biofilm en ausencia de antibiótico). En cambio, el metronidazol y la azitromicina sí provocan unos ligeros cambios debido a:

- La disminución en un 16,9% de *Paludibacteraceae_F0058* y el aumento de *Prevotella*, *Campylobacter*, *Fusobacterium* y *Treponema* en un 7,3%, 10,7%, 13,8% y 10,1% respectivamente en el caso del metronidazol.
- En el caso de la azitromizina existe una disminución de *Paludibacteraceae_F0058* en un 4,3% y de *Campylobacter* en un 20,1%, mientras que aumenta *Fusobacterium* un 12,5% y *Treponema* un 15,4%.

En el caso de la muestra 43 al igual que en la 42 la amoxicilina – ác. clavulánico no cambia las proporciones de abundancia en comparación al control positivo. Además, en este caso metronidazol y azitromicina también provocan ligeros cambios provocados por:

- Un aumento del 41,4% de *Phocaeicola* y del 46% de *Tannerella* y una disminución del 14,8% de *Prevotella* como consecuencia de la aplicación de metronidazol.

- En este caso la Azitromicina provoca un aumento del 20,5% de *Phocaeicola*, del 14,4% de *Tannerella* y del 11% de Paludibacteraceae_F0058. Sin embargo, tiene lugar una disminución del 18,1% de *Oribacterium*.

En las muestras 42 y 43, se encuentran entre los 4 géneros más predominantes Paludibacteraceae_F0058 y la *Prevotella*. En estas dos muestras de distintos dientes procedentes del mismo paciente se observa cómo los diferentes antibióticos pueden provocar un efecto distinto en el mismo género:

- La amoxicilina - ác. clavulánico no provoca efecto sobre Paludibacteraceae_F0058 en ninguna de las dos muestras. En cambio, sobre *Prevotella* produce un aumento del 4,5% en la muestra 42 y una disminución del 19,9% en la 43.
- El metronidazol provoca una disminución del Paludibacteraceae_F0058 del 16,9% en la muestra 42 y un aumento del 2,5% en la 43. Además, sobre la *Prevotella* se observa un aumento del 7,3% en el caso de la muestra 42 y una disminución del 14,8% en la 43.
- En el caso de la azitromicina, tiene lugar una disminución de Paludibacteraceae_F0058 del 4,3% en la muestra 42 y aumento del 11% en la 43. Sin embargo, *Prevotella* no se ve modificada en ninguna de las dos muestras en comparación con el control positivo.

Paciente 4

Géneros	Amoxicilina - ác. clavulánico		Metronidazol		Azitromicina	
	Muestra 42	Muestra 43	Muestra 42	Muestra 43	Muestra 42	Muestra 43
F0058	0,8%	-1,6%	-16,9%	2,5%	-4,3%	11,0%
Prevotella	4,5%	-19,9%	7,3%	-14,8%	1,1%	-0,5%
Campylobacter	0,1%	-	10,7%	-	-20,1%	-
Fusobacterium	-2,3%	-	13,8%	-	12,5%	-
Treponema	0,8%	-	10,1%	-	15,4%	-
Oribacterium	-	1,5%	-	5,8%	-	-18,1%
Phocaeicola	-	8,6%	-	41,4%	-	20,5%
Tannerella	-	8,2%	-	46,0%	-	16,4%

Tabla R.4.5.1. Porcentaje de aumento o disminución de los géneros más abundantes en las muestras 42 y 43, procedentes del paciente número 4, en comparación con la abundancia de esos géneros con el control (muestra de biofilm en ausencia de antibiótico), tras la aplicación de los diferentes antibióticos. El gradiente de color indica el grado de aumento o disminución de ese género (disminución representada en azul y aumento en rojo). Los géneros Paludibacteraceae_F0058 y *Prevotella* son los dos únicos géneros, de los más abundantes, que se encuentran tanto en la muestra 42 como en la 43, por lo que se puede comparar el efecto de los antibióticos sobre el mismo género en muestras procedentes de diferentes dientes del mismo paciente.

En el **paciente 6** se observa que tras la aplicación de los diferentes antibióticos se mantienen los mismos géneros como los más abundantes. Sin embargo, existen cambios en las proporciones de abundancia de los géneros en comparación al control (muestra de biofilm en ausencia de antibiótico). Las abundancias de los diferentes géneros y los porcentajes de variación se muestran en la gráfica R.4.5.2 y en la tabla R.4.5.2. Es importante recalcar que en este paciente, ambas muestras sufren una inhibición en la cantidad de biofilm tras exposición a los antibióticos (Gráfica R.4.4.1). Por tanto, una composición bacteriana similar indicaría que la mayoría de la comunidad microbiana se ve afectada por el antimicrobiano. Sin embargo, algunos grupos bacterianos aparecen más afectados que otros.

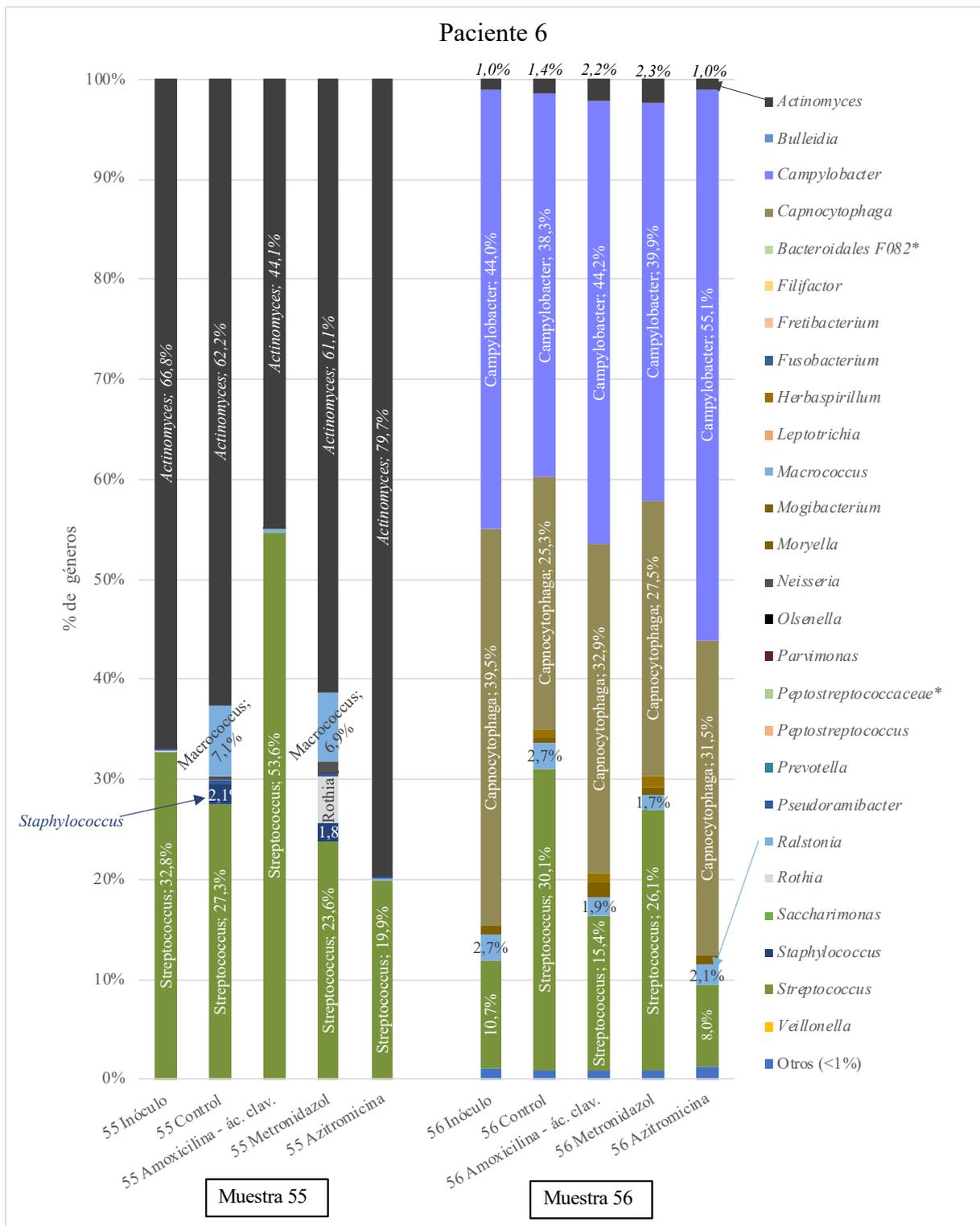
En el caso de la muestra 55 se observa cómo tanto metronidazol como azitromicina inhiben por completo a *Macrocooccus* y *Staphylococcus*, mientras que la amoxicilina – ác. clavulánico no tiene efecto. Además, la amoxicilina – ác. clavulánico provoca una disminución del 29,1% de *Actinomyces* junto con un aumento del 96,4% de *Streptococcus* en comparación con el control positivo. El metronidazol y la azitromicina provocan la disminución de *Streptococcus* en un 13,4 y 27% respectivamente. En cambio, el metronidazol no influye sobre *Actinomyces* y posibilita el crecimiento de *Rothia*, mientras que la azitromicina sí aumenta *Actinomyces* en un 28,1%.

En la muestra 56 también existe un cambio de abundancias con respecto al control. Los 3 antibióticos estimulan el crecimiento de *Campylobacter* y *Capnocytophaga*, mientras que disminuyen *Ralstonia* y *Streptococcus*. Además, la amoxicilina – ác. clavulánico y el metronidazol estimulan *Actinomyces* mientras que la azitromicina lo disminuye.

En la muestra 55 y 56 se encuentra entre los 4 géneros más predominantes *Actinomyces* y *Streptococcus*. Se observa cómo los diferentes antibióticos sobre estas dos muestras diferentes procedentes del mismo paciente, en la mayoría de las ocasiones, provocan un efecto diferente en el mismo género:

- La amoxicilina - ác. clavulánico inhibe *Actinomyces* en la muestra 55 mientras que los estimula en la 56. Del mismo modo estimula *Streptococcus* en la muestra 55 y los inhibe en la 56.
- El metronidazol inhibe en el mismo grado a *Streptococcus* tanto en la muestra 55 como en la 56, mientras que sobre *Actinomyces* no tiene efecto en la muestra 55 y estimula su crecimiento en la 56.

- Por último, la azitromicina estimula *Actinomyces* en la muestra 55 y lo inhibe en la 56. Sobre *Streptococcus* tiene un efecto inhibitor más intenso en la muestra 56.



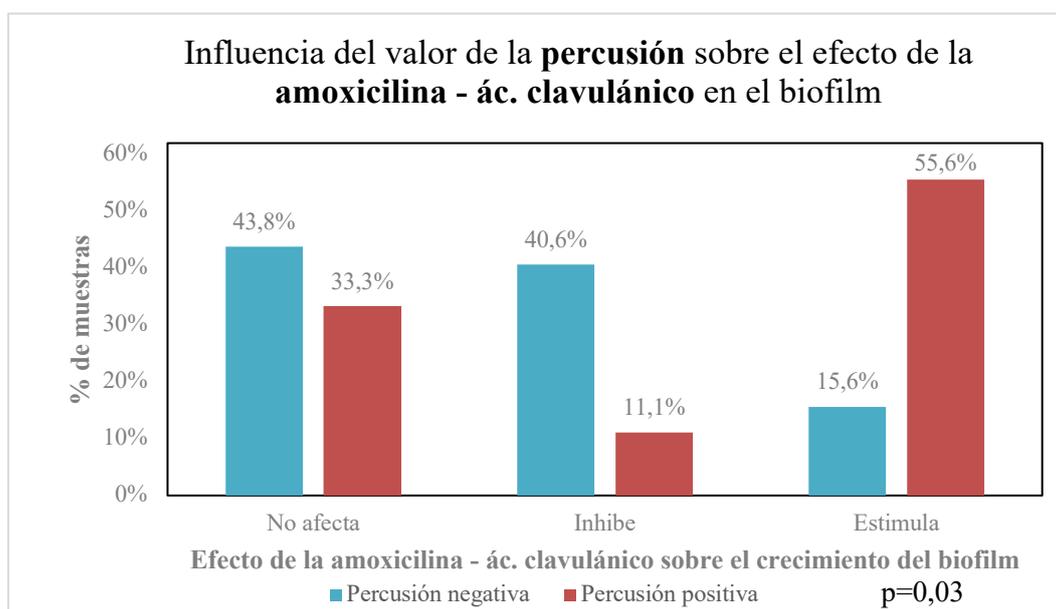
Gráfica R.4.5.2. Representación gráfica del porcentaje de géneros presentes en las muestras 55 y 56 obtenidas del paciente número 6. Se muestra en la gráfica el nombre los géneros más abundantes de cada muestra. Los asteriscos indican que las secuencias correspondientes no se han podido asignar a nivel de género, por lo que se indica el nivel filogenético anterior.

Paciente 6						
Géneros	Amoxicilina - ác. clavulánico		Metronidazol		Azitromicina	
	Muestra 55	Muestra 56	Muestra 55	Muestra 56	Muestra 55	Muestra 56
<i>Actinomyces</i>	-29,1%	54,9%	-1,8%	63,2%	28,1%	-29,8%
<i>Streptococcus</i>	96,4%	-48,9%	-13,4%	-13,5%	-27,0%	-73,4%
<i>Macrococcus</i>	-99,8%	-	-2,6%	-	-100,0%	-
<i>Staphylococcus</i>	-100,0%	-	-2,6%	-	-100,0%	-
<i>Campylobacter</i>	-	15,4%	-	4,0%	-	43,8%
<i>Capnocytophaga</i>	-	30,3%	-	8,8%	-	24,7%
<i>Ralstonia</i>	-	-27,9%	-	-37,9%	-	-20,6%

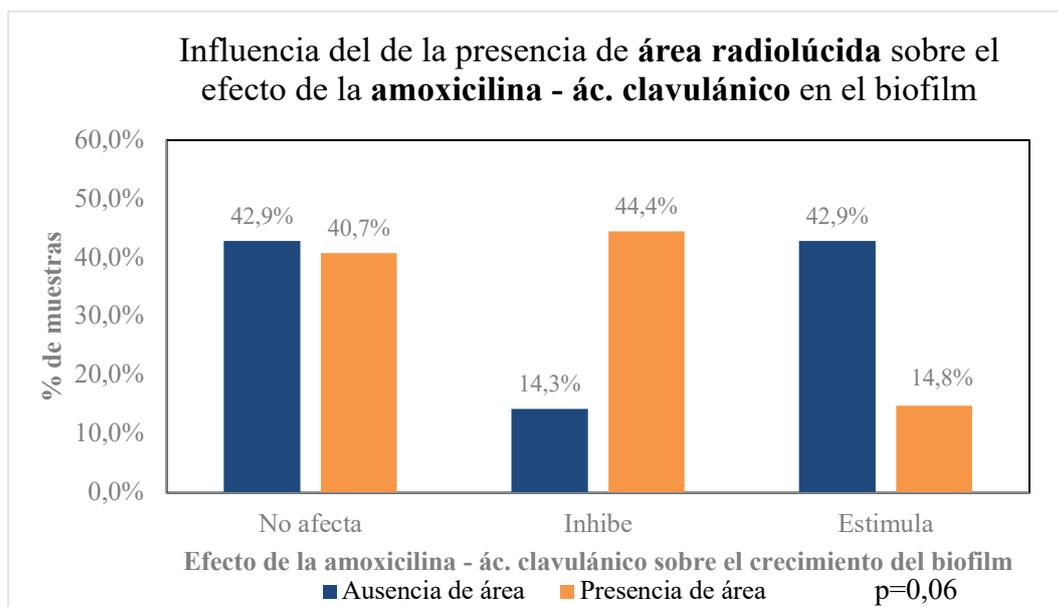
Tabla R.4.5.2. Se muestra el porcentaje de aumento o disminución de los géneros más abundantes en las muestras 55 y 56 correspondientes al paciente número 6, en comparación con la abundancia de esos géneros con el control positivo (muestra de biofilm en ausencia de antibiótico), tras la aplicación de los diferentes antibióticos. El gradiente de color indica el grado de aumento o disminución de ese género (disminución representada en azul y aumento en rojo). Los géneros *Actinomyces* y *Streptococcus* son los dos únicos géneros, de los más abundantes, que se encuentran tanto en la muestra 55 como en la 56, por lo que se puede comparar el efecto de los antibióticos sobre el mismo género en muestras procedentes de diferentes dientes del mismo paciente.

5. CORRELACIÓN ENTRE LOS DATOS CLÍNICOS Y EL EFECTO ANTIBIÓTICO

Se ha analizado la influencia de las diferentes situaciones clínicas sobre el efecto antibiótico en el crecimiento de biofilm endodóntico mediante la prueba del chi cuadrado. Cabe destacar que la percusión fue positiva (dolor a la percusión, con el mango del espejo, en el diente problema en comparación con los dientes contiguos) en el 55,6% de los casos en los que la amoxicilina - ác. clavulánico produjo una inducción del crecimiento de biofilm, siendo negativa en el 40,6% de los casos en los que la amoxicilina - ác. clavulánico inhibió dicha formación, hallándose una asociación significativa entre la respuesta dolorosa a la percusión y el patrón de crecimiento del biofilm (gráfica R.5.1). Finalmente, se ha observado una tendencia en la asociación entre la presencia de área radiolúcida apical y el efecto de este antibiótico. En concreto, en el 44,4% de los casos en los que existía área radiolúcida apical, en el diente problema, la amoxicilina - ác. clavulánico inhibió el crecimiento del biofilm, mientras que en el 42,9% de las muestras en las que no existía área radiolúcida la amoxicilina - ác. clavulánico estimuló la formación de la biopelícula ($p=0,06$) (gráfica R.5.2). No se halló ninguna otra asociación entre los diferentes datos clínicos recogidos y la influencia de los antibióticos sobre la formación de biofilm.

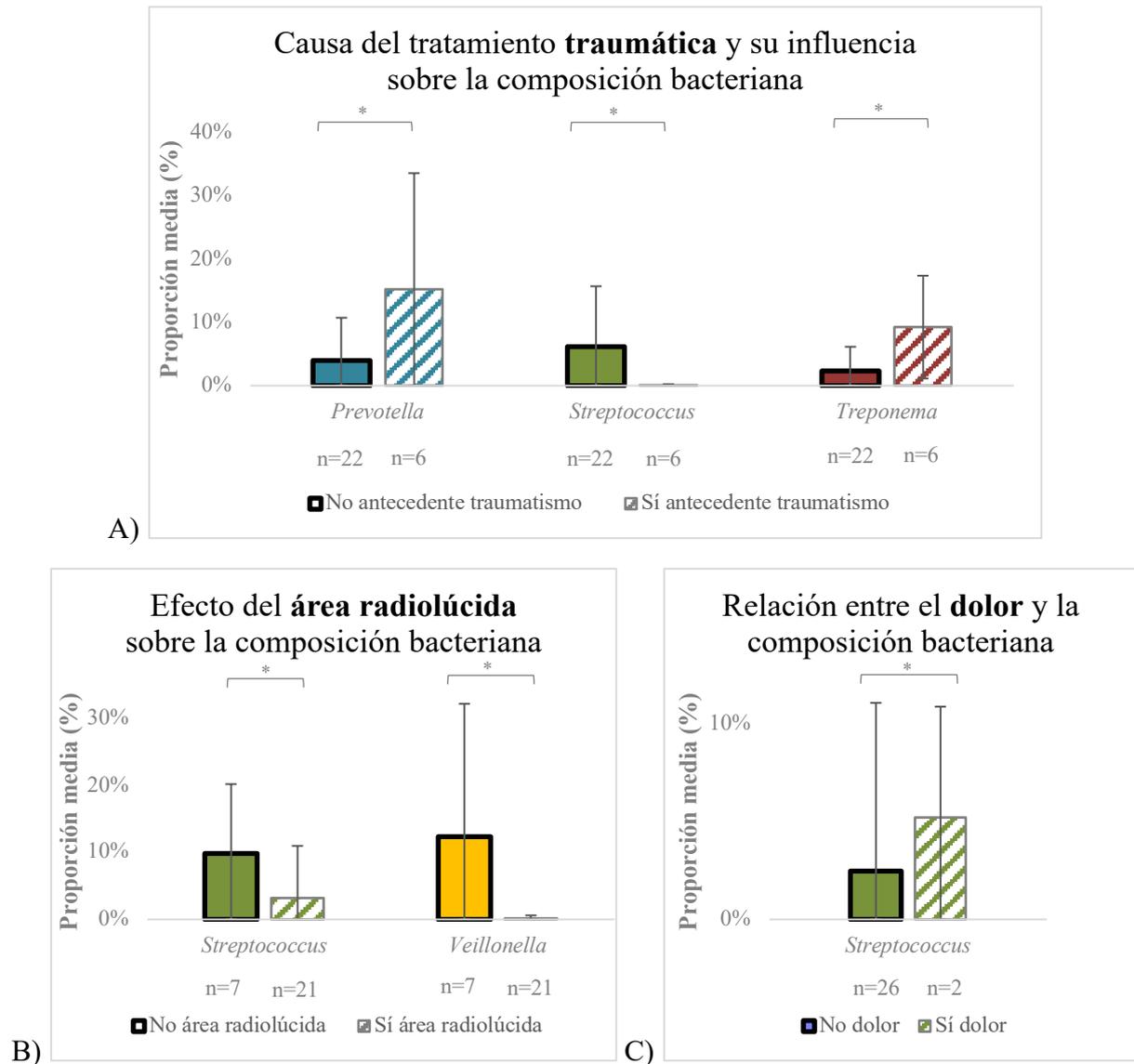


Gráfica R.5.1. Representación gráfica de la asociación entre la presencia de dolor a la percusión y la influencia de la amoxicilina - ác. clavulánico sobre la dinámica de crecimiento de biofilm de origen endodóntico.



Gráfica R.5.2. Representación gráfica de la asociación entre la presencia de área radiolúcida y la influencia de la amoxicilina - ác. clavulánico sobre la dinámica de crecimiento de biofilm de origen endodóntico.

Mediante el test de U de Mann – Whitney se ha estudiado la relación entre las diferentes características clínicas de los pacientes y la abundancia media de los 17 géneros con una proporción mayor al 2% en el inóculo. Se puede observar una mayor cantidad de *Prevotella* y *Treponema* cuando el tratamiento de conductos tuvo lugar a causa de la necrosis pulpar por un traumatismo previo ($p < 0,05$). Sin embargo, hubo una mayor abundancia de *Streptococcus* cuando la caries provocó la necrosis pulpar ($p < 0,05$). La presencia de área radiolúcida se relaciona con una menor cantidad de *Streptococcus* y *Veillonella*. Por último, la presencia de dolor previo al tratamiento de conductos está relacionado con una mayor abundancia media de *Streptococcus* ($p < 0,05$). La influencia de las diferentes características clínicas sobre la composición bacteriana se encuentra representada en la gráfica R.5.3.



Gráfica R.5.3. Representación gráfica de la correlación entre diferentes aspectos clínicos y su influencia sobre la composición bacteriana. Los corchetes y el asterisco indican la existencia de diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Se muestra sólo aquellos aspectos clínicos que han influido de forma significativa sobre alguno de los 17 géneros con mayor proporción media en el inóculo de 28 muestras. A) Se muestra una mayor proporción de *Prevotella* y *Treponema* cuando existe antecedente de traumatismo. Sin embargo, hay una mayor abundancia de *Streptococcus* cuando los pacientes no han sufrido un traumatismo previo. B) *Streptococcus* y *Veillonella* se encuentran con menor abundancia en la composición bacteriana cuando existe área radiolúcida. C) Se ha detectado mayor cantidad de *Streptococcus* cuando los pacientes han presentado dolor previo al tratamiento de conductos.

DISCUSIÓN

Para prevenir y tratar con éxito una enfermedad es necesario conocer su etiología y patogénesis. Se sabe que las bacterias causantes de la periodontitis apical, presentes en el interior de los conductos se encuentran organizadas en estructuras complejas dando lugar a un biofilm o biopelícula (Siqueira y Rôças, 2009; Jhajharia et al., 2015; Neelakantan, 2018). Las interacciones entre microorganismos presentes en un biofilm dotan a la comunidad de propiedades y funciones que no pueden observarse en cada componente de forma individual (Marsh, 2005; Hargreaves & Cohen, 2011). De tal forma, que puede observarse un aumento de la virulencia (Sundqvist et al., 1979; Baumgartner et al., 1992, Feuille et al., 1996, Kesavalu et al., 1998), mayor resistencia frente a diferentes antimicrobianos y una mejoría en la eficiencia metabólica (Brook, 1986; Hargreaves & Cohen, 2011; Neelakantan et al., 2017). Por lo tanto, las estrategias de desinfección deben ser probadas en condiciones lo más parecidas posible a la realidad. La realización de una correcta prueba de sensibilidad antimicrobiana adquiere una importancia capital en el caso del uso de antibióticos, puesto que un uso incorrecto de éstos puede provocar consecuencias graves.

En la presente tesis se ha llevado a cabo la puesta a punto de un modelo de estudio *in vitro* RTCA para muestras procedentes de conductos radiculares necróticos. Se ha testado el efecto de diferentes antibióticos (amoxicilina – ác. clavulánico, metronidazol y azitromicina) en la curva de crecimiento de la biopelícula. Así mismo se han identificado los géneros presentes tanto en la muestra obtenida del conducto radicular, como en el biofilm formado a partir de esas muestras en el sistema RTCA xCelligence®.

La recogida de la muestra se llevó a cabo en condiciones de asepsia, siguiendo los estándares que recomienda la literatura (Tabla I.2).

A diferencia de la mayoría de los artículos publicados, en los cuales se selecciona de forma artificial las especies a testar en el estudio, en la presente tesis se ha utilizado la muestra recogida directamente del interior de los conductos (Swimberghe et al., 2019). De esta manera, los resultados conseguidos se asemejan más a la realidad, permitiendo las interacciones entre las diferentes colonias presentes en el biofilm intrarradicular (Hargreaves & Cohen, 2011).

El sistema RTCA xCelligence®, a diferencia de otros modelos de estudio como el modelo AAA (ACTA active attachment) (Van der Waal et al., 2016) o el MAM (multiplaque artificial mouth) (Koopman et al., 2015, 2016) denominados de punto final (“end point”), permite el seguimiento en tiempo real durante todo el periodo de formación del biofilm. La

presente tesis representa el primer ensayo en el que se estudia la dinámica de formación de la biopelícula de origen endodóntico. Además, el RTCA xCELLigence® se trata de un modelo de estudio *in vitro* validado y aceptado para otro tipo de muestras orales (Mira et al., 2019), en el que se ha demostrado que la muestra inicial a partir de la cual se forma biofilm (inóculo) y el biofilm resultante en el control positivo sin antibiótico, tras 8 horas de incubación, son similares en su composición. Sin embargo, existen ligeras diferencias, siendo la más importante el aumento de *Streptococcus* en el biofilm obtenido del control positivo (gráficas R.3.2-3). Este aumento de Firmicutes es habitual en los experimentos de microcosmos, debido a que la presencia de azúcares en los medios de cultivo suele estimular el crecimiento de estos organismos fermentativos (Klug et al., 2016). Por ello, el cultivo de biofilms endodónticos se podría probablemente refinar en el futuro modificando el medio de cultivo utilizado para reducir el nivel de azúcares.

El uso de discos de dentina en el modelo de estudio *in vitro* sería el sustrato más cercano a la realidad (Swimberghe et al., 2019), pero como inconveniente presenta que sólo se puede utilizar en modelos de estudio del tipo “end point”. Al igual que la mayoría de los autores, se ha utilizado un medio de cultivo rico en nutrientes (BHI) (tabla I.3) suplementado con hemina menadiona y vitamina K para permitir el crecimiento de la mayor cantidad de especies bacterianas posibles (Llena et al., 2019).

El tiempo de incubación del biofilm suele estar comprendido en la literatura entre 1 y 70 días (Koopman et al., 2015; van der Waal et al., 2016; Swimberghe et al., 2019; Mira et al., 2019), en el presente estudio se dejó madurar el biofilm sólo hasta las 8 horas. Se ha observado que en la mayoría de las curvas de crecimiento de biofilm endodóntico, a las 8 horas es el momento en el que se alcanza la fase estacionaria. Por lo tanto, a partir de las 8 horas, debido a la cantidad limitada de nutrientes, comenzará la fase de declive modificándose la composición bacteriana final de la biopelícula (Ryan & Ray 2017; Romero, 2018) (figura I.3 y gráfica M.2).

Se seleccionó la amoxicilina - ác. clavulánico como uno de los antibióticos a testar porque la amoxicilina es el antibiótico de primera elección recomendado por AEDE (Segura-Egea et al., 2020), la ESE (Segura-Egea et al., 2017a; Segura-Egea et al., 2018), la ADA (Lockhart et al., 2019) y la AAE (AAE., 2017) frente infecciones de origen endodóntico. Además, es el antibiótico más utilizado en el mundo según la literatura disponible (tabla I.5). En España el antibiótico más utilizado por cirujanos orales (Segura-Egea et al., 2010) y endodoncistas (Rodríguez-Núñez et al., 2010) es la amoxicilina – ác. clavulánico 875/125 mg.

En el presente estudio también se utilizó metronidazol y azitromicina porque junto a la clindamicina son los antibióticos más utilizados en la literatura después de la amoxicilina (tabla I.5). La ADA recomienda administrar metronidazol a un paciente que tras 2-3 días de pauta antibiótica con amoxicilina no presenta mejoría en la sintomatología y en el caso de pacientes con alergia a la amoxicilina recomienda administrar azitromicina o clindamicina (Lockhart et al., 2019). Las dosis recomendadas son de 500 mg de metronidazol y de 500 mg en el caso de la azitromicina (Segura-Egea et al., 2017a; AEMPS 2018, Lockhart et al., 2019). El presente estudio ha permitido por tanto evaluar la eficacia de estos antibióticos tan utilizados a la hora de eliminar biofilms endodónticos *in vitro*.

Mira et al. (2019) llevaron a cabo dos lavados suaves de 150 μ L de tampón fosfato sobre el pocillo de la placa de microtitulación, con el objetivo de eliminar las células no adheridas en el fondo del pocillo, para posteriormente proceder a la disgregación del biofilm adherido para su análisis. En cambio, en el presente estudio, de los 200 μ L totales que contiene cada pocillo se retiró 100 μ L y a continuación, se procedió a la disgregación del biofilm adherido en el fondo del pocillo. Mediante este procedimiento se evita el riesgo de eliminar bacterias adheridas formando biofilm durante la retirada del sobrenadante. Sin embargo, si existe alguna bacteria en suspensión, que no se ha adherido al fondo del pocillo formando biofilm, también puede ser detectada e incluida como parte de la composición bacteriana del biofilm de ese pocillo. En cualquier caso, esas bacterias no adheridas no afectan a la impedancia y por tanto no afectan a las medidas del biofilm.

Diferentes autores han estudiado la composición bacteriana del interior de los conductos radiculares mediante técnicas de secuenciación (Persoon et al., 2017; Bouillaguet et al., 2018; Íriboz et al., 2018; Tawfi et al., 2018). De media, el número total de muestras secuenciadas mediante Illumina Miseq, en los estudios disponibles en la literatura, es de 16 (anexo 3). Peerson et al. (2017) presentan el tamaño muestral más grande con un total de 22 muestras. Por lo tanto, se puede considerar que en el presente estudio se ha alcanzado un tamaño muestral representativo, puesto que se ha secuenciado un total de 28 muestras procedentes del interior de los conductos radiculares necróticos.

En el presente estudio, al igual que en los valores medios obtenidos de la literatura, los phyla más abundantes son Bacteroidetes y Firmicutes. Las diferencias de abundancia media más acentuadas se observan en Fusobacteria (10% en la literatura frente a un 6% en el presente estudio). Tras el análisis de la composición bacteriana del presente estudio se observa una considerable similitud a nivel de phylum con respecto a los valores descritos en la literatura (gráfica I.2 y R.2.1.1).

Por otra parte, se observa una gran variabilidad interestudio con respecto a la abundancia y frecuencia de aparición de los diferentes géneros presentes en una infección endodóntica (anexo 3), hecho corroborado por Manoil et al. (2020) quien realizó una revisión sistemática sobre la composición bacteriana del interior de los conductos. Respecto a la composición bacteriana obtenida en el presente estudio, tan solo 5 géneros de los 10 más abundantes (gráfica R.2.1.2) se encuentran entre los 10 con mayor proporción de media en la literatura (gráfica I.3), a saber: *Prevotella*, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Actinomyces* y *Pyramidobacter*. Por otra parte, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Treponema*, *Porphyromonas*, y *Dialister* se encuentran entre los géneros más frecuentes en el presente estudio y en la literatura (gráfica I.4 y R.2.1.3). Es importante destacar, que *Phocaeicola* es el género con una abundancia media mayor en el presente estudio, con un 10,7%. Sin embargo, de los 10 artículos disponibles en la literatura, que describen la composición bacteriana mediante Pirosecuenciación o Illumina Miseq, sólo se encuentra *Phocaeicola* en el estudio de Santos et al. (2011) y Persoon et al. (2017) en un 12% y 3,5% respectivamente. Si tenemos en cuenta la frecuencia de aparición de los géneros en los estudios disponibles en la literatura, se observa que *Prevotella* y *Fusobacterium* son los dos géneros más frecuentemente encontrados, al igual que ocurre en el presente estudio (gráfica I.4 y R.2.1.3).

Una vez realizada la comparación de la composición bacteriana obtenida de los pacientes que no han tomado antibiótico (inóculo) y los que sí, se observa que el efecto del antibiótico disminuye el número de phyla predominantes (aquellos con una abundancia media superior al 1%). Synergistetes, Spirochaetes y Epsilonbacteraeota pasan de tener una abundancia media entre el 5 y el 3%, en los pacientes que no han tomado antibiótico, a una abundancia menor al 1% en los pacientes que sí han tomado antibiótico previo a la recogida de muestra. Tras el tratamiento antibiótico existe una disminución de Proteobacterias y un aumento de Bacteroidetes, Firmicutes y Actinobacterias, respecto al inóculo (gráfica R.2.3.1). La composición resultante de los pacientes que han tomado antibiótico es similar, a nivel de phyla, respecto a la media descrita en la literatura de pacientes que no habían tomado antibiótico. Sin

embargo, Actinobacteria se encuentra en mayor proporción a la descrita por algunos como Tzanetakis et al. (2015) y Tawfi et al. (2018) (anexo 1). A pesar de que los valores de Actinobacteria, obtenidos en muestras de pacientes que han tomado antibiótico, son superiores a la media de la literatura, son valores similares a los descritos por Özok et al. (2013) y Persoon et al. (2017). El CCA (gráfica R.9.3) muestra que hay una tendencia a que las muestras procedentes de pacientes que han tomado antibiótico se parezcan a nivel de composición y se diferencien de las muestras de pacientes que no han tomado antibiótico. En cambio, esta diferencia no es estadísticamente significativa, en parte por el pequeño tamaño muestral de pacientes que han tomado antibiótico. Por lo tanto, no se puede concluir que el tratamiento antibiótico sistémico influya en la composición bacteriana del interior de los conductos radiculares necróticos, y trabajos futuros deberán estudiar la composición microbiana en un mayor número de muestras radiculares de pacientes que hayan tomado antibióticos para poder determinar si esta tendencia se mantiene.

Mira et al. (2019) describieron la dinámica de formación en tiempo real de biofilm formados a partir de inóculos tomados de saliva, raspado de lengua y placa dental mediante el sistema RTCA xCELLigence®. En el presente estudio se ha conseguido estudiar por primera vez la dinámica de formación de biofilm de origen endodóntico y su susceptibilidad frente a amoxicilina – ác. clavulánico, metronidazol y azitromicina.

Se observan diferentes patrones de respuesta de la biopelícula de origen endodóntico frente a los antibióticos testados: en uno de ellos, al que hemos denominado tipo I, ningún antibiótico modifica la curva de crecimiento del biofilm; tipo II, todos los antibióticos producen inducción en la formación del biofilm; tipo III, todos los antibióticos producen inhibición en la formación del biofilm; tipo IV, cada antibiótico tiene un efecto diferente sobre la curva de crecimiento del biofilm. El tipo IV ha sido el más frecuente y puede subdividirse en: tipo IVa, uno o dos antibióticos producen inducción del biofilm y el resto no influyen; tipo IVb, uno o dos antibióticos producen inhibición del biofilm y el resto no influyen; tipo IVc: uno o dos antibióticos producen inducción del biofilm y uno o dos antibióticos producen inhibición del biofilm.

La mayor parte del efecto de los antibióticos se encuentra comprendida entre el 25% de inhibición y el 25% de inducción del biofilm. El metronidazol es el que ha inhibido en mayor medida la formación de biofilm (inhibición severa >50%) y la azitromicina el que ha inhibido en el mayor porcentaje de los casos. Todos ellos han provocado inducción de la biopelícula en algunos casos (gráfica R.4.1.3). Estos resultados difieren de los obtenidos por Bresco et al.

(2006), quienes aplicaron diferentes antibióticos a cepas bacterianas aisladas de lesiones periapicales y pericoronaritis. Observaron que la amoxicilina y amoxicicilina – ác. clavulánico eran los antibióticos con mayor número de cepas susceptibles, existiendo diferencia estadísticamente significativa entre el número de cepas susceptibles y resistentes. En cambio, no obtuvieron diferencia significativa con la azitromicina y el metronidazol, siendo el metronidazol el antibiótico con mayor número de cepas resistentes. Estas diferencias respecto al efecto de los antibióticos pueden ser debidas a que, las bacterias de forma aislada se comportan de manera diferente a si se encuentran estructuradas formando un biofilm (Marsh, 2005; Hargreaves & Cohen, 2011). Por este motivo, los datos presentados en esta tesis apoyan el uso de muestras reales para testar la susceptibilidad antibiótica, ya que el comportamiento de un biofilm de composición compleja, donde existen multitud de interacciones y sinergias, no se puede inferir a partir de la sensibilidad antibiótica de algunos de los componentes de dicho biofilm de forma aislada.

En las condiciones testadas de temperatura y medio de cultivo, se puede establecer en 8 horas el tiempo que tarda el biofilm de origen endodóntico en alcanzar la fase estacionaria. No obstante, se observa que existe poca diferencia en los valores de inhibición y estimulación en la formación de biofilm por parte de los antibióticos testados entre las 4 y 8 horas de seguimiento. Esto quiere decir que a las 4 horas se dispone de valores preliminares muy similares a los que se obtendrán a las 8 horas. Por lo tanto, se propone el sistema RTCA xCelligence® como modelo *in vitro* rápido para realizar pruebas de sensibilidad frente diferentes antibióticos, puesto que a las 4 horas se podría disponer de información representativa respecto a la sensibilidad de los antibióticos frente al biofilm específico del conducto radicular (gráfica R.4.1.2). Cabe destacar que las pruebas de sensibilidad antibiótica utilizadas de forma rutinaria en el ámbito hospitalario, como las pruebas de microdilución o los E-test, realizadas sobre cultivos puros, llevan al menos 24 en producir un resultado, y que las pruebas genéticas de sensibilidad antibiótica realizadas en muestras periodontales también necesitan al menos 24 h para el diagnóstico (Horz & Conrads, 2007).

Tras el análisis de la composición bacteriana resultante de la aplicación de los diferentes antibióticos en el RTCA xCelligence®, se evidencia que cada paciente presenta una composición bacteriana, en el interior de los conductos radiculares, distinta al resto de pacientes. Además, cada una las muestras obtenidas del RTCA xCelligence® tras la aplicación de los antibióticos, son muy similares entre sí y con respecto al control positivo, por lo que no se puede concluir que los antibióticos testados influyan de forma general en la estructura

poblacional bacteriana, si bien se observan diferencias significativas en algunos grupos taxonómicos concretos (gráficas R.4.3.1-2).

Por lo tanto, la variabilidad de la composición bacteriana y las múltiples posibles interacciones entre los diferentes géneros es la causa más probable de los diferentes efectos de los antibióticos sobre la dinámica de formación de biofilm obtenidos en el presente estudio.

El *Streptococcus* demuestra tener una gran influencia en la infección de origen endodóntico puesto que es uno de los géneros con mayor abundancia y frecuencia en la composición de las 28 muestras secuenciadas. También cabe destacar que se encuentra en mayor proporción cuando la causa del tratamiento fue por caries (causa no traumática), cuando existía área radiolúcida y en presencia de dolor ($p < 0,05$) (gráfica R.5.3). Esto es interesante dado que esta bacteria se encuentra entre los agentes etiológicos mejor estudiados de la caries dental. Por último, cabe destacar que la azitromicina es el único antibiótico que disminuyó significativamente la abundancia media de *Streptococcus* (gráfica R.4.3.3), teniendo en cuenta que las condiciones del estudio propician el crecimiento de *Streptococcus* ($p < 0,05$) (gráfica R.3.3).

El *Enterococcus Faecalis* es considerado el principal patógeno causante de las infecciones endodónticas persistentes (Zhang et al., 2015; Alghamdi & Shakir, 2020), por ello es ampliamente utilizado en modelos *in vitro* de biofilm (Ozdemir et al., 2010; Seneviratne et al., 2013; De Meyer et al., 2017). Sin embargo, esta afirmación se encuentra en entredicho puesto que otros microorganismos como *Prevotella* y *Fusobacterium* han sido aislados en mayor medida (Prada et al., 2019). Además, en la presente tesis no ha sido detectado *Enterococcus* en ninguna de las muestras analizadas.

Tras el análisis de la curva de crecimiento de biofilm de los 3 pacientes de los cuales se obtuvo 2 muestras de dientes diferentes se observa un comportamiento intrapaciente diferente del biofilm frente a los antibióticos. Los diferentes antibióticos en una de las muestras producen un efecto de inhibición o estimulación mientras que en la otra muestra del mismo paciente hay un efecto distinto (paciente 1 y 4) o cambio de intensidad (paciente 6) (tabla R.4.4.1 y gráficas R.4.5.1-2). Estos resultados pueden ser debidos a la gran variabilidad bacteriana en cada una de las muestras. Se ha observado que las 2 muestras procedentes de un mismo paciente difieren en gran medida en su composición, aunque se ha hallado de 1 a 2 géneros que se encuentran de forma predominante en ambas muestras del mismo paciente (gráficas R.2.2.1 y R.4.3.1). El distinto efecto del mismo antibiótico sobre la proporción del mismo género bacteriano es intrigante y puede deberse a la presencia de distintas especies o cepas con patrones distintos de

resistencia antimicrobiana, o a que la acción de un determinado antibiótico sobre una bacteria depende también de la interacción con otros integrantes del biofilm y las características de la matriz extracelular. Ambas posibilidades recalcan la dificultad de establecer la efectividad de un determinado antibiótico incluso si se conoce la composición bacteriana del biofilm, que es por ejemplo el protocolo utilizado en las técnicas de selección de antibiótico en muestras periodontales, donde mediante qPCR o chips de hibridación se determina la presencia de periodontopatógenos y en base a la misma se recomienda el uso de una determinada combinación antibiótica (Horz & Conrads, 2007). Nuestros datos sugieren, al menos para los biofilms endodónticos, que una misma bacteria puede verse inhibida o favorecida por el mismo antibiótico, y que por tanto una prueba de crecimiento de biofilm bajo distintos antibióticos es más fiable que un estudio de composición y la posterior inferencia de los antibióticos a los que esa composición pueda ser sensible.

Tras el análisis de los resultados no se observa que los datos clínicos del paciente previos al tratamiento condicionen la eficacia de los antibióticos testados. Sin embargo, la amoxicilina - ác. clavulánico suele estimular la formación de biofilm (55,6% de los casos) cuando la percusión es positiva e inhibir (40,6% de los casos) cuando es negativa ($p < 0,05$) (gráfica R.5.1). También se observa que la amoxicilina – ác. clavulánico estimula la formación de biofilm en el 42,9% de los casos cuando no hay área radiolúcida, mientras que inhibe en el 44,4% de los casos cuando sí hay área radiolúcida ($p > 0,05$) (gráfica R.5.2). Se ha detectado una mayor abundancia media de *Veillonella* y *Streptococcus* en los pacientes que presentaron área radiolúcida ($p < 0,05$), mayor abundancia media de *Prevotella* y *Treponema* en los que el tratamiento de conductos se llevó a cabo por causa de un traumatismo antiguo ($p < 0,05$) y una mayor abundancia media de *Streptococcus* cuando el paciente tuvo dolor previo al tratamiento y éste fue por causa de caries ($p < 0,05$) (gráfica R.5.3). De Brito et al. (2020) observó una mayor proporción de *Porphyromonas* ($p < 0,05$) y de *Prevotella* ($p > 0,05$) cuando los pacientes tuvieron síntomas previos al tratamiento de conductos. El hecho de que la amoxicilina - ác. clavulánico tienda a inhibir la formación del biofilm cuando existe área radiolúcida puede ser debido a que en estos casos suele haber una mayor abundancia media de *Streptococcus*, el cual es susceptible a la acción de este antibiótico (gráfica R.4.3.3 y R.4.3.5). Estos resultados, aunque preliminares, sugieren que trabajos futuros deberían estudiar las posibles correlaciones entre datos clínicos y microbiológicos en un mayor tamaño muestral, para establecer criterios rápidos de selección provisional de tratamiento antibiótico antes de conocer el resultado de las pruebas de sensibilidad correspondientes.

En resumen, se puede decir que el tratamiento antibiótico frente a infecciones endodónticas es poco eficaz, pudiendo incluso estimular el crecimiento del biofilm en algunos casos. Por ello, debemos seguir las indicaciones de la AEDE, ESE, ADA y AAE respecto al uso de antibióticos en endodoncia con el fin de evitar consecuencias, como la resistencia a los antibióticos por un mal uso de los mismos (AAE, 2017; Segura-Egea et al., 2017a; Segura-Egea et al., 2018; Lockhart et al., 2019).

En investigaciones futuras se propone el aumento del tamaño muestral de pacientes que han tomado antibiótico sistémico previo al tratamiento de conductos, para estudiar la composición bacteriana y compararla con pacientes que no hayan tomado antibiótico. De esta manera se podría clarificar la eficacia de dichos tratamientos para reducir o eliminar el biofilm endodóntico *in vivo*. Además, mediante el sistema RTCA xCELLigence® se pueden testar diferentes estrategias de desinfección local sobre biofilms procedentes del foco de infección, por lo que este sistema puede ser una herramienta de gran ayuda a la hora de encontrar y testar nuevos tratamientos antisépticos contra las infecciones endodónticas. Esperamos que la presente tesis estimule el interés en el desarrollo de sistemas *in vitro* que sirvan como modelos representativos del biofilm del conducto radicular y así diseñar protocolos que permitan testar la susceptibilidad antibiótica de dichos biofilms, mejorando el tratamiento de estas infecciones y contribuyendo a un uso apropiado y responsable de los antimicrobianos que reduzca la incidencia de las multirresistencias.

CONCLUSIONES FINALES

1. El sistema xCELLigence® permite el estudio en tiempo real de la formación de biofilms procedentes de conductos radiculares necróticos. Se establece en 8 horas el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria y obtener una composición bacteriana en el biofilm *in vitro* que sea representativa de la existente en las muestras originales.
2. La composición bacteriana obtenida de los conductos radiculares necróticos de pacientes que no habían tomado antibiótico en el último mes, es altamente variable intra- e interpaciente, mostrándose diente dependiente, indicando que es una infección claramente polimicrobiana donde no se puede establecer un único agente etiológico.
3. La composición bacteriana de pacientes que sí han tomado antibiótico en el último mes muestra una tendencia a ser distinta a la de aquellos pacientes que no han tomado antibiótico, pero el pequeño tamaño muestral de este tipo de muestras no permite extraer conclusiones significativas.
4. A) Todos los antibióticos testados sobre el biofilm real obtenido a partir de muestras de conductos radiculares de dientes necróticos, en unos casos inhibieron el crecimiento, en otros no tuvieron efecto y en otros produjeron inducción, no pudiendo relacionar este efecto con la composición original de la muestra, al menos a nivel taxonómico de género. Ello sugiere que la composición bacteriana no sería buen predictor de la eficacia de un tratamiento antibiótico en este tipo de infecciones.
B) El metronidazol fue el antibiótico que inhibió en mayor cantidad y la azitromicina el que inhibió en el mayor porcentaje de los casos. Los antibióticos testados, aún cuando tuvieron un efecto inhibitor del biofilm, no influyeron de forma general en la composición bacteriana.
5. Los datos clínicos del paciente obtenidos en este estudio no predicen el efecto de los diferentes antibióticos sobre el patrón de crecimiento del biofilm, si bien existe una tendencia a un mayor efecto inductor del biofilm al utilizar la amoxicilina - ácido clavulánico en aquellos casos con percusión positiva, y un mayor efecto inhibitor de dicho antibiótico en casos con presencia de área radiolúcida apical.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aas, J.A. Paster, B.J. Stokes, L.N. Olsen, I. Dewhirst, F.E. (2015): “Defining the normal bacterial flora of the oral cavity”, *J Clin Microbiol*, 43(11),5721-32.

Ackermans, F. Klein, J.P. Frank, R.M. (1981): “Ultrastructural localization of immunoglobulins in carious human dentine”, *Arch Oral Biol*, 26(11),879-86.

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) (2017b): FICHA TÉCNICA AUGMENTINE 500mg/125 mg POLVO PARA SUSPENSION ORAL EN SOBRES, https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/56683/FT_56683.html , [consultado en 21-10-2019].

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) (2017c): FICHA TÉCNICA AUGMENTINE 875 mg/125 mg COMPRIMIDOS RECUBIERTOS CON PELÍCULA, https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/59515/FT_59515.html , [consultado en 21-10-2019].

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) (2019a): FICHA TÉCNICA DALACIN 300 mg CÁPSULAS DURAS, https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/58783/FT_58783.html , [consultado en 21-10-2019].

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) (2019b): FICHA TECNICA AZITROMICINA TEVA 500 mg COMPRIMIDOS RECUBIERTOS CON PELICULA EFG, https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/67340/FT_67340.html#5-2-propiedades-farmacocin-ticas, [consultado en 10-11-2019]

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) (2016): FICHA TÉCNICA METRONIDAZOL NORMON 250 mg COMPRIMIDOS EFG, https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/62223/FT_62223.html , [consultado en 21-10-2019].

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) (2017d): FICHA TÉCNICA RHODOGIL 750.000 U.I/125 mg COMPRIMIDOS RECUBIERTOS CON PELÍCULA, https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/50057/FT_50057.html , [consultado en 21-10-2019].

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) (2018): FICHA TÉCNICA AZITROMICINA NORMON 500 mg COMPRIMIDOS RECUBIERTOS CONPELÍCULA EFG https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/66065/FT_66065.html , [consultado en 21-10-2019].

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) (2017a): FICHA TÉCNICA AMOXICILINA CINFA 500 MG CÁPSULAS DURA EFG , https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/62586/FT_62586.html , [consultado en 21-10-2019].

Agnihotry, A. Fedorowicz, Z. van Zuuren, E.J. Farman, A.G. Al-Langawi, J.H. (2016): “Antibiotic use for irreversible pulpitis”, *Cochrane Database Syst Rev*, 17,2,CD004969.

Agnihotry, A. Gill, K.S. Stevenson Iii, R.G. Fedorowicz, Z. Kumar, V. Sprakel, J. Cohen, S. Thompson, W. (2019): “Irreversible Pulpitis - A Source of Antibiotic Over-Prescription?”, *Braz Dent J*, 30(4),374-379.

Alghamdi, F. & Shakir, M. (2020): “The Influence of Enterococcus faecalis as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review”, *Cureus*, 12(3):e7257.

Al Masalma, M. Raoult, D. Roux, V. (2009): “*Phocaeicola abscessus* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium isolated from a human brain abscess sample”, *Int J Syst Evol Microbiol*, 59(Pt 9),2232-7.

Al Masan, A.A. Dummer, P.M.H. Farnell, D.J.J. Vianna, M.E. (2018): “Antibiotic prescribing for endodontic therapies: a comparative survey between general dental practitioners and final year Bachelor of Dental Surgery students in Cardiff, UK”, *Int Endod J*, 51(7),717-728.

Alattas, H.A. y Alyami, S.H. (2017): “Prescription of antibiotics for pulpal and periapical pathology among dentists in southern Saudi Arabia”, *J Glob Antimicrob Resist*, 9,82-8.

Alonso-Ezpeleta, O. Martín-Jiménez, M. Martín-Biedma, B. López-López, J. Forner-Navarro, L. Martín-González, J. Montero-Miralles, P. Jiménez-Sánchez, M.D.C. Velasco-Ortega, E. Segura-Egea, J.J. (2018): “Use of antibiotics by spanish dentists receiving postgraduate training in endodontics”, *J Clin Exp Dent*, 10(7),e687-e695.

American Association of Endodontists (AAE) (1999): “Prescription for the future: responsible use of antibiotics in endodontic therapy”, *AAE Endodontics Colleagues for Excellence*, 1–8.

American Association of Endodontists (AAE) (2017): “AAE Position Statement: AAE Guidance on the Use of Systemic Antibiotics in Endodontics”, *J Endod*, 43(9),1409-1413.

Anderl, J.N. Zahller, J. Roe, F. Stewart, P.S. (2003): “Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin”, *Antimicrob Agents Chemother*, 47(4),1251-6.

Andersson, L. Andreasen, J.O. Day, P. Heithersay, G. Trope, M. DiAngelis, A.J. Kenny, D.J. Sigurdsson, A. Bourguignon, C. Flores, M.T. Hicks, M.L. Lenzi, A.R. Malmgren, B. Moule, A.J. Tsukiboshi, M. (2017): “Guidelines for the Management of Traumatic Dental Injuries: 2. Avulsion of Permanent Teeth”, *Pediatr Dent*, 15;39(6),412-419.

Argyaki, A, Markvart, M. Stavnsbjerg, C. Kragh, KN. Ou, Y. Bjørndal, L. Bjarnsholt, T. Petersen, PM. (2018): “UV light assisted antibiotics for eradication of in vitro biofilms”, *Sci Rep*, 5;8(1),16360.

Atienza, J.M. Zhu, J. Wang, X. Xu, X. Abassi, Y. (2005): “Dynamic monitoring of cell adhesion and spreading on microelectronic sensor arrays”, *J Biomol Screen*, 10(8),795-805.

Balaban, N.Q. Merrin, J. Chait, R. Kowalik, L. Leibler, S. (2004): “Bacterial persistence as a phenotypic switch”, *Science*, 305(5690),1622-5.

Barr, W.H. Zola, E.M. Candler, E.L. Hwang, S.M. Tendolkar, A.V. Shamburek, R. Parker, B. Hilty, M.D. (1994): “Differential absorption of amoxicillin from the human small and large intestine”, *Clin Pharmacol Ther*, 56(3),279-85.

Bartold, P.M. (2017): “Personalized/Precision Dentistry - The Future of Dentistry?”, *Aust Dent J*, 62(3),257.

Baumgartner, J.C. & Xia, T. (2003): “Antibiotic susceptibility of bacteria associated with endodontic abscesses”, *J Endod*, 29(1),44-7.

Baumgartner, J.C. Falkler, W.A. Jr. Beckerman, T. (1992): “Experimentally induced infection by oral anaerobic microorganisms in a mouse model”, *Oral Microbiol Immunol*, 7(4),253-6.

Blochs, S. Thurnheers T. Murakami, Y. Belibasakis, G.N. Schäffer, C. (2017): “Behavior of two *Tannerella forsythia* strains and their cell surface mutants in multispecies oral biofilms”, *Mol Oral Microbiol*, 32(5),404-418.

- Blome, B. Braun, A. Sobarzo, V. Jepsen, S. (2008): "Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction", *Oral Microbiol Immunol*, 23(5),384-90.
- Bolfoni, M.R. Pappen, F.G. Pereira-Cenci, T. Jacinto, R.C. (2018): "Antibiotic prescription for endodontic infections: a survey of Brazilian Endodontists", *Int Endod J*, 51(2),148-156.
- Borriello, G. Werner, E. Roe, F. Kim, A.M. Ehrlich, G.D. Stewart, P.S. (2004): "Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms". *Antimicrob Agents Ch*,48,2659-64.
- Bouillaguet, S. Manoil, D. Girard, M. Louis, J. Gaïa, N. Leo, S. Schrenzel, J. Lazarevic, V. (2018): "Root Microbiota in Primary and Secondary Apical Periodontitis", *Front Microbiol*, 9,2374.
- Brennan, C.A. & Garrett, W.S. (2019): "Fusobacterium nucleatum - symbiont, opportunist and oncobacterium", *Nat Rev Microbiol*, 7(3):156-166.
- Brescó-Salinas, M. Costa-Riu, N. Berini-Aytés, L. Gay-Escoda, C. (2006): "Antibiotic susceptibility of the bacteria causing odontogenic infections", *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 11,E70-5.
- Brescó, M. Costa, N. Berini, L, Gay, C. (2006): "Susceptibilidad antibiótica de las bacterias causantes de infecciones odontogénicas", *Med. oral patol. oral cir.buca*, 11,E70-5.
- Brook, I. (1986): "Encapsulated anaerobic bacteria in synergistic infections", *Microbiol Rev*, 50(4),452-7.
- Brook, I. (2003): "Microbiology and management of endodontic infections in children", *J Clin Pediatr Dent*, 28(1),13-7.
- Busanello, F.H. Petridis, X. So, M.V.R. Dijkstra, R.J.B. Sharma, P.K. van der Sluis, L.W.M. (2019): "Chemical biofilm removal capacity of endodontic irrigants as a function of biofilm structure: optical coherence tomography, confocal microscopy and viscoelasticity determination as integrated assessment tools", *Int Endod J*, 52(4),461-474.
- Caldwell, D.E. Atuku, E. Wilkie, D.C. Wivcharuk, K.P. Karthikeyan, S. Korber, D.R. Schmid, D.F. Wolfaardt, G.M. (1997): "Germ theory vs. community theory in understanding and controlling the proliferation of biofilms", *Adv Dent Res*, 11(1),4-13.
- Cercenado, E. & Saavedra-Lozano, J. (2009): "El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I)", *An Pediatr Contin*, 7(4),214-7.
- Ceri, H. Olson, M.E. Stremick, C. Read, R.R. Morck, D. Buret, A. (1999): "The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms", 37(6),1771-6.
- Chiang, W.C. Nilsson, M. Jensen, P.Ø. Højby, N. Nielsen, T.E. Givskov, M. Tolker-Nielsen, T. (2013): "Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms", 57(5),2352-61.
- Claesson, M.J. Wang, Q. O'Sullivan, O. Greene-Diniz, R. Cole, J.R. Ross, R.P. O'Toole, P.W. (2010): "Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions", *Nucleic Acid Res*, 38(22),e200.
- Costerton, J.W. (2007): *The biofilm primer*, Berlin, Springer-Verlag.
- Costerton, J.W. Lewandowski, Z. Caldwell, D.E. Korber, D.R. Lappin-Scott, H.M. (1995): "Microbial biofilms", *Annu Rev Microbiol*, 49,711-45.
- Cvek, M. Cleaton-Jones, P.E. Austin, J.C. Andreasen, J.O. (1982): "Pulp reactions to exposure after experimental crown fractures or grinding in adult monkeys", *J Endod*, 8(9),391-7.

- Dailey, Y.M. & Martin, M.V. (2001): “Are antibiotics being used appropriately for emergency dental treatment?”, *Br Dent J*, 191(7), 391–3.
- de Brito, L.C.N. Doolittle-Hall, J. Lee, C.T. Moss, K. Bambirra-Júnior, W. Tavares, W.L.F. Ribeiro-Sobrinho, A.P. Teles, F.R.F. (2020): “The apical root canal system microbial communities determined by next-generation sequencing”, *Sci Rep*, 10(1):10932.
- De Meyer, S. Meire, M.A. Coenye, T. De Moor, R.J. (2017): “Effect of laser-activated irrigation on biofilms in artificial root canals”, *Int Endod J*, 50(5),472-479.
- de-Souza-Silva, C.M. Guilhelmelli, F. Zamith-Miranda, D. de Oliveira, M.A. Nosanchuk, J.D. Silva-Pereira, I. Albuquerque, P. (2018): “Broth Microdilution In Vitro Screening: An Easy and Fast Method to Detect New Antifungal Compounds”, *J. Vis. Exp.*, (132), e57127.
- Dethlefsen, L. McFall-Ngai, M. Relman, D.A. (2007): “An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease”, *Nature*, 449(7164),811-8.
- Diangelis, A.J. Andreasen, J.O. Ebeleseder, K.A. Kenny, D.J. Trope, M. Sigurdsson, A. Andersson, L. Bourguignon, C. Flores, M.T. Hicks, M.L. Lenzi, A.R. Malmgren, B. Moule, A.J. Pohl, Y. Tsukiboshi, M. (2017): “Guidelines for the Management of Traumatic Dental Injuries: 1. Fractures and Luxations of Permanent Teeth”, *Pediatr Dent*, 39(6),401-411.
- Donlan, R.M. & Costerton, J.W. (2002): “Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms”, *Clin Microbiol Rev*, 5(2),167-93.
- Driffield, K. Miller, K. Bostock, J.M. O'Neill, A.J. Chopra, I. (2008): “Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms”, *J Antimicrob Chemother*, 61(5):1053-6.
- Dzidic, M. Collado, M.C. Abrahamsson, T. Artacho, A. Stensson, M. Jenmalm, M.C. Mira, A. (2018): “Oral microbiome development during childhood: an ecological succession influenced by postnatal factors and associated with tooth decay”, *ISME J*, 12(9),2292-2306.
- Edgar, R.C. (2016): “UCHIME2: improved chimera prediction for amplicon sequencing”, *BioRxiv*, 074252.
- Exterkate, R.A. Crielaard, W. Ten Cate, JM. (2010): “Different response to amine fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model”, *Caries Res*, 44(4),372-9.
- Ferrer, M.D. & Mira, A. (2016): “Oral Biofilm Architecture at the Microbial Scale”, *Trends Microbiol*, 24(4),246-248.
- Ferrer, M.D. Lamarche, B. Mira, A. (2017a): “Studying bacterial biofilms using cellular impedance. xCELLigence® Real-time cell analyzers”, App Note No17.
- Ferrer, M.D. Rodriguez, J.C. Álvarez, L. Artacho, A. Royo, G. Mira, A. (2017b): “Effect of antibiotics on biofilm inhibition and induction measured by real-time cell analysis”, *J Appl Microbiol*, 122(3):640-650.
- Feuille, F. Ebersole, J.L. Kesavalu, L. Stepfen, M.J. Holt, S.C. (1996): “Mixed infection with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in a murine lesion model: potential synergistic effects on virulence”, *Infect Immun*, 64(6),2094-100.
- Fouad, A.F. Rivera, E.M. Walton, R.E. (1996): “Penicillin as a supplement in resolving the localized acute apical abscess”, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 81(5),590-5.

- Furukawa, S. Kuchma, S.L. O'Toole, G.A. (2006): "Keeping their options open: acute versus persistent infections", *J Bacteriol*, 188(4), 1211-7.
- Garberoglio, R. Brännström, M. (1976): "Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules", *Arch Oral Biol*, 21, 355.
- Germack, M. Sedgley, C.M. Sabbah, W. Whitten, B. (2017): "Antibiotic Use in 2016 by Members of the American Association of Endodontists: Report of a National Survey", *J Endod*, 43(10), 1615-1622.
- Hall-Stoodley, L. Costerton, J.W. Stoodley, P. (2004): "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases", *Nat Rev Microbiol*, 2(2), 95-108.
- Hall-Stoodley, L. Stoodley, P. (2009): "Evolving concepts in biofilm infections", *Cell Microbiol*, 11(7), 1034-43.
- Hall, C.W. & Mah, T.F. (2017): "Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria", *FEMS Microbiol Rev*, 41(3), 276-301.
- Hamady, M. & Knight, R. (2009): "Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges", *Genome Res*, 19(7), 1141-1152.
- Hargreaves, K.M. & Cohen, S. (2011): *Cohen Vías de la pulpa*, 10ª edición, Barcelona, Elsevier España.
- Herrera, M.L. (1999): "Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio", *Rev. méd. Hosp. Nac. Niños*, 34, 33-41.
- Høiby, N. Bjarnsholt, T. Givskov, M. Molin, S. Ciofu, O. (2010): "Antibiotic resistance of bacterial biofilms", *Int J Antimicrob Agents*, 35(4), 322-32.
- Hong, B.Y. Lee, T.K. Lim, S.M. Chang, S.W. Park, J. Han, S.H. Zhu, Q. Safavi, K.E. Fouad, A.F. Kum, K.Y. (2013): "Microbial analysis in primary and persistent endodontic infections by using pyrosequencing", *J Endod*, 39(9), 1136-40.
- Horz, H.P. & Conrads, G. (2007): "Diagnosis and anti-infective therapy of periodontitis", *Expert Rev Anti Infect Ther*, 5(4), 703-15.
- Huang, R. Li, M. Gregory, R.L. (2011): "Bacterial interactions in dental biofilm", *Virulence*, 2(5), 435-44.
- İriboz, E. Arıcan, B. Kolukırkık, M. Karacan, I. Sazak, H. (2018): "Detection of the unknown components of the oral microflora of teeth with periapical radiolucencies in a Turkish population using next-generation sequencing techniques", *Int Endod J*, 51(12), 1349-1357.
- Jhajharia, K. Parolia, A. Shetty, K.V. Mehta, L.K. (2015): "Biofilm in endodontics: A review", *J Int Soc Prev Community Dent*, 5(1), 1-12.
- Kandemir, S. & Ergül, N. (2000): "Grievances in cases using antibiotics due to orodental problems and assessment of the need for antibiotics", *Int Dent J*, 50(2):73-7.
- Kaplan, J.B. (2010): "Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses", *J Dent Res*, 89(3), 205-18.
- Kaptan, R.F. Haznedaroglu, F. Basturk, F.B. Kayahan, M.B. (2013): "Treatment approaches and antibiotic use for emergency dental treatment in Turkey", *Ther Clin Risk Manag*, 9, 443-9.
- Kesavalu, L. Holt, S.C. Ebersole, J.L. (1998): "Virulence of a polymicrobial complex, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*, in a murine model", *Oral Microbiol Immunol*, 13(6), 373-7.

- Keskin, C. Demiryürek, E.Ö. Onuk, E.E. (2017): “Pyrosequencing Analysis of Cryogenically Ground Samples from Primary and Secondary/Persistent Endodontic Infections”, *J Endod*, 43(8),1309-1316.
- Khemaleelakul, S. Baumgartner, J.C. Pruksakorn, S. (2002): “Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility”, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 94(6),746-55.
- Kishen, A. Haapasalo, M. (2010): “Biofilm models and methods of biofilm assessment”, *Endod Topics*, 22,58-78.
- Klug, B. Santigli, E. Westendorf, C. Tangl, S. Wimmer, G. Grube, M. (2016): “From Mouth to Model: Combining in vivo and in vitro Oral Biofilm Growth”, *Front Microbiol*, 21(7),1448.
- Kolenbrander, P.E. (2000): “Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems”, *Annu Rev Microbiol*, 54,413-37.
- Koopman, J.E. Buijs, M.J. Brandt, B.W. Keijser, B.J. Crielaard, W. Zaura, E. (2016): “Nitrate and the Origin of Saliva Influence Composition and Short Chain Fatty Acid Production of Oral Microcosms”, *Microb Ecol*, 72(2),479-92.
- Koopman, J.E. Röling, W.F. Buijs, M.J. Sissons, C.H. ten Cate, J.M. Keijser, B.J. Crielaard, W. Zaura, E. (2015): “Stability and resilience of oral microcosms toward acidification and *Candida* outgrowth by arginine supplementation”, *Microb Ecol*, 69(2),422-33.
- Kumar, P.S. Griffen, A.L. Moeschberger, M.L. Leys, E.J. (2005): “Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis”, *J Clin Microbiol*, 43(8):3944-55.
- Lacey, R.W. Lord, V.L. Howson, G.L. Luxton, D.E. Trotter, I.S. (1983): “Double-blind study to compare the selection of antibiotic resistance by amoxycillin or cephradine in the commensal flora”, *Lancet*, 2(8349),529-32.
- Lang, P.M. Jacinto, R.C. Dal Pizzol, T.S. Ferreira, M.B. Montagner, F. (2016): “Resistance profiles to antimicrobial agents in bacteria isolated from acute endodontic infections: systematic review and meta-analysis”, *Int J Antimicrob Agents*, 48(5),467-474.
- Langeland, K. Rodrigues, H. Dowden, W. (1974): “Periodontal disease, bacteria, and pulpal histopathology”, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 37(2),257-70.
- Lewis, K. (2005): “Persister cells and the riddle of biofilm survival”, *Biochemistry (Mosc)*, 70(2),267-74.
- Lin, J. Shen, Y. Haapasalo, M. (2013) “A comparative study of biofilm removal with hand, rotary nickel-titanium, and self-adjusting file instrumentation using a novel in vitro biofilm model” *J Endod*,39(5),658-63.
- Llena, C. Almarche, A. Mira, A. López, M.A. (2019): “Antimicrobial efficacy of the supernatant of *Streptococcus dentisani* against microorganisms implicated in root canal infections”, *J Oral Sci*, 61(1),184-194.
- Llewelyn, M.J. Fitzpatrick, J.M. Darwin, E.Tonkin-Crine, S. Gorton, C. Paul, J. Peto, T.E.A. Yardley, L. Hopkins, S. Walker, A.S. (2017): “The antibiotic course has had its day”, *BMJ*, 26;358,j3418.
- Lockhart, P.B. Tampi, M.P. Abt, E. Aminoshariae, A. Durkin, M.J. Fouad, A.F. Gopal, P. Hatten, B.W. Kennedy, E. Lang, M.S. Patton, L.L. Paumier, T. Suda, K.J. Pilcher, L. Urquhart, O. O'Brien, K.K. Carrasco-Labra, A. (2019): “Evidence-based clinical practice guideline on antibiotic use for the urgent management of pulpal- and periapical-related dental pain and intraoral swelling: A report from the American Dental Association”, *J Am Dent Assoc*, 150(11),906-921.e12.

- Luo, T.L. Hayashi, M. Zsiska, M. Circello, B. Eisenberg, M. Gonzalez-Cabezas, C. Foxman, B. Marrs, C.F. Rickard, A.H. (2019): "Introducing BAIT (Biofilm Architecture Inference Tool): a software program to evaluate the architecture of oral multi-species biofilms", *Microbiology*, 165(5);527-537.
- Machado de Oliveira, J.C. Siqueira, J.F. Jr. Rôças, I.N. Baumgartner, J.C. Xia, T. Peixoto, R.S. Rosado, A.S. (2007): "Bacterial community profiles of endodontic abscesses from Brazilian and USA subjects as compared by denaturing gradient gel electrophoresis analysis", *Oral Microbiol Immunol*, 22(1), 14-8.
- Mah, T.F. (2012): "Biofilm-specific antibiotic resistance", *Future Microbiol*, 7(9), 1061-72.
- Mainjot, A. D'Hoore, W. Vanheusden, A. Van Nieuwenhuysen, J.P. (2009): "Antibiotic prescribing in dental practice in Belgium", *Int Endod J*, 42(12), 1112-7.
- Manoil, D. Al-Manei, K. Belibasakis, G.N. (2020): "A Systematic Review of the Root Canal Microbiota Associated with Apical Periodontitis: Lessons from Next-Generation Sequencing", *Proteomics Clin Appl*, 17, e1900060.
- Marsh, P.D. (2005): "Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style", *J Clin Periodontol*, 32 Suppl 6, 7-15.
- Martín-González, J. & Segura-Egea, J.J. (2018): "Duración del tratamiento antibiótico en las infecciones endodoncias: cuanto más corto, mejor", *Endodoncia*, 36, 8-9.
- Martín-Jiménez, M. Martín-Biedma, B. López-López, J. Alonso-Ezpeleta, O. Velasco-Ortega, E. Jiménez-Sánchez, MC. Segura-Egea, J.J. (2018): "Dental students' knowledge regarding the indications for antibiotics in the management of endodontic infections", *Int Endod J*, 51(1), 118-127.
- Maslamani, M. y Sedeqi, F. (2018): "Antibiotic and Analgesic Prescription Patterns among Dentists or Management of Dental Pain and Infection during Endodontic Treatment", *Med Princ Pract*, 27(1), 66-72.
- Mejåre, I.A. Axelsson, S. Davidson, T. Frisk, F. Hakeberg, M. Kvist, T. Norlund, A. Petersson, A. Portenier, I. Sandberg, H. Tranaeus, S. Bergenholtz, G. (2012): "Diagnosis of the condition of the dental pulp: a systematic review", *Int Endod J*, 45(7), 597-613.
- Michelich, V. Pashley, D.H. Whitford, G.M. (1978): "Dentin permeability: a comparison of functional versus anatomical tubular radii", *J Dent Res*, 57(11-12), 1019-24.
- Mira, A. (2007): Horizontal gene transfer in oral bacteria. IN: Rogers A.H., ed. *Oral Molecular Microbiology*. Horizon Scientific Press. Chapter 3. 65-86.
- Mira, A. (2018): "Oral Microbiome Studies: Potential Diagnostic and Therapeutic Implications", *Adv Dent Res*, 29(1), 71-77.
- Mira, A. Artacho, A. Camelo-Castillo, A. Garcia-Esteban, S. Simon-Soro, A. (2017): "Salivary Immune and Metabolic Marker Analysis (SIMMA): A Diagnostic Test to Predict Caries Risk". *Diagnostics (Basel)*, 7(3).
- Mira, A. Buetas, E. Rosier, B. Mazurel, D. Villanueva-Castellote, A. Llana, C. Ferrer. MD. (2019): "Development of an in vitro system to study oral biofilms in real time through impedance technology: validation and potential applications", *J Oral Microbiol*, 11(1), 1609838.
- Molin, S. Tolker-Nielsen, T. (2003): "Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure", *Curr Opin Biotechnol*, 14(3), 255-61.
- Moore, PA. (1999): "Dental therapeutic indications for the newer long-acting macrolide antibiotics", *J Am Dent Assoc*, 130(9), 1341-3.

- Mulcahy, H. Charron-Mazenod, L. Lewenza, S. (2008): "Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms", *PLoS Pathog*, 4(11),e1000213.
- Munson, M. Pitt-Ford, T. Chong, B. Weightman, A. Wade, W. (2002): "Molecular and Cultural Analysis of the Microflora Associated with Endodontic Infections", *J Dent Res*, 81(11),761-766.
- Neelakantan, P. (2018): "Endodontic Microbiology-A Special Issue of Dentistry Journal", *Dent J*, 17;6(2).
- Neelakantan, P. Romero, M. Vera, J. Daood, U. Khan, A.U. Yan, A. Cheung, G.S.P. (2017): "Biofilms in Endodontics-Current Status and Future Directions" *Int J Mol Sci*, 11;18(8).
- Nikaido, H. (1998): "Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps", *Clin Infect Dis*, Suppl 1,S32-41.
- Okamura, K. Maeda, M. Nishikawa, T. Tsutsui, M. (1980): "Dentinal response against carious invasion: localization of antibodies in odontoblastic body and process", *J Dent Res*, 59(8),1368-73.
- Okamura, K. Tsubakimoto, K. Uobe, K. Nishida, K. Tsutsui, M. (1979): "Serum proteins and secretory component in human carious dentin", *J Dent Res*. 58(3),1127-23.
- Olsen, I. (2015): "Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance", *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 34(5),877-86.
- Ordinola-Zapata, R. Bramante, C.M. Aprecio, R.M. Handysides, R. Jaramillo, D.E. (2014) "Biofilm removal by 6% sodium hypochlorite activated by different irrigation techniques" *Int Endod J*,47(7),659-66.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2018): *Resistencia a los antibióticos*, <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibióticos> , [consultado en 21-10-2019].
- Özok, A.R. Persoon, I.F. Huse, S.M. Keijser, B.J. Wesselink, P.R. Crielaard, W. Zaura, E. (2012): "Ecology of the microbiome of the infected root canal system: a comparison between apical and coronal root segments", *Int Endod J*, 45(6),530-41.
- Palmer, N.A. Pealing, R. Ireland, R.S. Martin, M.V. (2000): "A study of therapeutic antibiotic prescribing in National Health Service general dental practice in England", *Br Dent J*, 188(10), 554-8.
- Parahitayawa, N.B. Jin, L. Leung, W.K. Yam, W.C. Samaranyake, LP. (2009): "Microbiology of odontogenic bacteremia: beyond endocarditis", *Clin Microbiol Rev*, 22(1),46-64.
- Parsek, M.R. Singh, P.K. (2003): "Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis", *Annu Rev Microbiol*, 57,677-701.
- Pashley, D.H. "Dynamics of the pulpo-dentin complex", *Crit Rev Oral Biol Med*, 7(2),104-33.
- Penesyan, A. Gillings, M. Paulsen, I.T. (2015): "Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities", *Molecules*, 20(4),5286-98.
- Persoon, I.F. Buijs, M.J. Özok, A.R. Crielaard, W. Krom, B.P. Zaura, E. Brandt, B.W. (2017): "The mycobiome of root canal infections is correlated to the bacteriome", *Clin Oral Investig*, 21(5),1871-1881.
- Peters, O.A. Bardsley, S. Fong, J. Pandher, G. Divito, E. (2011): "Disinfection of root canals with photon-initiated photoacoustic streaming", *J Endod*,37(7),1008-12.
- Prada, I. Mico-Muñoz, P. Giner-Lluesma, T. Mico-Martínez, P. Collado-Castellano, N. Manzano-Saiz, A. (2019): "Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review", *Med Oral Patol Oral Cir Buca*, 1;24(3),e364-e372.
- Prats, G. (2006): *Microbiología Clínica*, Madrid, Médica Panamericana.

- Qian, W. Ma, T. Ye, M. Li, Z. Liu, Y. Hao, P. (2019): "Microbiota in the apical root canal system of tooth with apical periodontitis", *BMC Genomics*, 20(Suppl 2),189.
- Reusser, F. (1975): "Effect of Lincomycin and Clindamycin on Peptide Chain Initiation", *Antimicrob Agents Chemother*, 7(1),32-7.
- Ricucci, D. Loghin, S. Siqueira, J.F. Jr. (2014): "Correlation between clinical and histologic pulp diagnoses", *J Endod*, 0(12),1932-9.
- Ricucci, D. Pascon, E.A. Ford, T.R. Langeland, K. (2006): "Epithelium and bacteria in periapical lesions", *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 101(2),239-49.
- Ricucci, D. Siqueira, J.F. Jr. (2010): "Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings", *J Endod*. 36(8),1277-88.
- Roche, Y. Yoshimori, RN. (1997): "In-vitro activity of spiramycin and metronidazole alone or in combination against clinical isolates from odontogenic abscesses", *J Antimicrob Chemother*, 40(3),353-7.
- Rodriguez-Núñez, A. Cisneros-Cabello, R. Velasco-Ortega, E. Llamas-Carreras, J.M. Torres-Lagares, D. Segura-Egea, J.J. (2009): "Antibiotic use by members of the Spanish Endodontic Society", *J Endod*, 35(9),1198-203.
- Romero, R. (2018): *Microbiología y parasitología humana*, 4ª edición, México, editorial médica Panamericana.
- Rooney, L.M. Amos, W.B. Hoskisson, P.A. McConnell, G. (2020): "Intra-colony channels in *E. coli* function as a nutrient uptake system", *ISME J*.
- Ryan, K.J. & Ray C.G. (2017): *Sherris Microbiología Médica*, 6ª edición, México, McGraw-Hill Educación.
- Sadek, R.W. Moussa, S.M. El Backly, R.M. Hammouda, A.F. (2019): "Evaluation of the Efficacy of Three Antimicrobial Agents Used for Regenerative Endodontics: An In Vitro Study", *Microb Drug Resist*, 25(5);761-771.
- Sakamoto, M. Rôças, I.N. Siqueira, J.F. Jr. Benno, Y. (2006): "Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections", *Oral Microbiol Immunol*, 21(2),112-22.
- Sakko, M. Tjäderhane, L. Rautemaa-Richardson, R. (2016): "Microbiology of Root Canal Infections", *Prim Dent J*, 5(2),84-89.
- Salipante, S.J. Kawashima, T. Rosenthal, C. Hoogestraat, D.R. Cummings, L.A. Sengupta, D.J. Harkins, T.T. Cookson, B.T. Hoffman, N.G. (2014): "Performance comparison of Illumina and ion torrent next-generation sequencing platforms for 16S rRNA-based bacterial community profiling", *Appl Environ Microbiol*, 80(24),7583-9.
- Salvo, F. Polimeni, G. Moretti, U. Conforti, A. Leone, R. Leoni, O. Motola, D. Dusi, G. Caputi, A.P. (2007): "Adverse drug reactions related to amoxicillin alone and in association with clavulanic acid: data from spontaneous reporting in Italy", *J Antimicrob Chemother*, 60(1),121-6.
- Santos, A.L. Siqueira, J.F. Jr. Rôças, I.N. Jesus, E.C. Rosado, A.S. Tiedje, J.M. (2011): "Comparing the bacterial diversity of acute and chronic dental root canal infections" *PLoS One*, 6(11),e28088.
- Scannapieco, F.A. (2013): "The oral microbiome: Its role in health and in oral and systemic infections", *Clin Microbiol Newsl*, 35(20), 163-169.

- Schaudinn, C. Jaramillo, D. Freire, M.O. Sedghizadeh, P.P. Nguyen, A. Webster, P. Costerton, J.W. Jiang, C. (2013) "Evaluation of a nonthermal plasma needle to eliminate ex vivo biofilms in root canals of extracted human teeth" *Int Endod J*, 46(10),930-7.
- Schmieder, R. & Edwards, R. (2011): "Quality control and preprocessing of metagenomic datasets", *Bioinformatics*, 27(6),863-4.
- Segura-Egea, J.J. Gould, K. Şen, B.H. Jonasson, P. Cotti, E. Mazzoni, A. Sunay, H. Tjäderhane, L. Dummer, P.M.H. (2017a): "Antibiotics in Endodontics: a review", *Int Endod J*, 50(12),1169-1184.
- Segura-Egea, J.J. Gould, K. Şen, B.H. Jonasson, P. Cotti, E. Mazzoni, A. Sunay, H. Tjäderhane, L. Dummer, P.M.H. (2018): "European Society of Endodontology position statement: the use of antibiotics in endodontics", *Int Endod J*, 51(1),20-25.
- Segura-Egea, J.J. Martín-González, J. Jiménez-Sánchez, M.D.C. Crespo-Gallardo, I. Saúco-Márquez , J.J. Velasco-Ortega, E. (2017b): "Worldwide pattern of antibiotic prescription in endodontic infections", *Int Dent J*, 67(4),197-205.
- Segura-Egea, J.J. Sánchez, B. Montero, P. Martín – González, J. Alonso, O. Forner, N. (2020): "Recomendaciones de la asociación española de endodoncia sobre el uso de antibióticos en endodoncia", http://www.aede.info/PDF/RECOMENDACIONES_AEDE_ANTIBIOTICOS.pdf , [consultado en 06-07-2020].
- Segura-Egea, J.J. Velasco-Ortega, E. Torres-Lagares, D. Velasco-Ponferrada, M.C. Monsalve-Guil, L. LLamas-Carreras, J.M. (2010): "Pattern of antibiotic prescription in the management of endodontic infections among Spanish oral surgeons", *Int Endod J*, 43(4), 342–50.
- Seltzer, S. Bender, I.B., Ziontz, M. (1963): "The dynamics of pulp inflammation: correlations between diagnostic data and actual histologic findings in the pulp", *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 16,846-71.
- Seneviratne, C.J. Yip, J.W. Chang, J.W. Zhang, C.F. Samaranayake, LP. (2013): "Effect of culture media and nutrients on biofilm growth kinetics of laboratory and clinical strains of *Enterococcus faecalis*", *Arch Oral Biol*, 58(10):1327-34.
- Siqueira, J. & Rôças, I. (2004b): "Treponema species associated with abscesses of endodontic origin", *Oral Microbiol Immunol*, 19(5), pp.336-339.
- Siqueira, J. & Rôças, I. (2005a): "Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1-current molecular technologies for microbiological diagnosis.", *J Endod*, 31(6),411-23.
- Siqueira, J. & Rôças, I. (2005b): "Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2-Redefining the endodontic microbiota", *J Endod*, 31(7),488-98.
- Siqueira, J. & Rôças, I. (2008): "Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures", *J Endod*, 34, pp.1291-1301.
- Siqueira, J. & Rôças, I. (2009): "Community as the unit of pathogenicity: An emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis", *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endo*, 107(6), pp.870-878.
- Siqueira, J. Rôças, I. Rosado, A. (2005): "Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) to the Analysis of Endodontic Infections", *J Endod*, 31(11), pp.775-782.
- Siqueira, J.F. Jr. & Rôças I.N. (2009): "Diversity of Endodontic Microbiota Revisited", *J Dent Res*, 88(11),969–981.

- Siqueira, J.F. Jr. Alves, F.R. Rôças, I.N. (2011): “Pyrosequencing analysis of the apical root canal microbiota” *J Endod*, 37(11),1499-503.
- Siqueira, J.F. Jr. Fouad, A.F. Rôças, I.N. (2012): “Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes”, *J Oral Microbiol*, 4.
- Siqueira, J.F. Jr. Rôças, I.N. Rosado, A.S. (2004a): “Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach”, *Oral Microbiol Immunol*, 19(6),363-70.
- Skucaité, N. Peciulienė, V. Manelienė, R. Maciulskienė, V. (2010): “Antibiotic prescription for the treatment of endodontic pathology: a survey among Lithuanian dentists”, *Medicina*, 46(12), 806–13.
- Slaton, K.P. Huffer, M.D. Wikle, E.J. Zhang, J. Morrow, C.D. Rhodes, S.C. Eleazer, P.D. (2017): “16S Ribosomal RNA Gene Sequencing to Evaluate the Effects of 6 Commonly Prescribed Antibiotics”, *J Endod*, 43(12),1984-198.
- Socransky, S.S. Haffajee, A.D. (2002): “Dental biofilms: difficult therapeutic targets”, *Periodontol 2000*, 28,12-55.
- Sogin, M. Morrison, H. Huber, J. Welch, D. Huses, S. Neal, P. Arrieta, J. Herndl, G. (2006): “Microbial diversity in the deep sea and the underexplored ‘rare biosphere’” *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(32), pp.12115-12120.
- Spellberg, B. (2016): “The New Antibiotic Mantra—“Shorter Is Better”, *JAMA Intern Med*, 176(9),1254-5
- Spicer, W.J. (2009): *Microbiología clínica y enfermedades infecciosas: texto y atlas en color*, 2ª edición, Barcelona, Elsevier.
- Stewart, P.S. Zhang, T. Xu, R. Pitts, B. Walters, M.C. Roe, F. Kikhney, J. Moter, A. (2016): “Reaction–diffusion theory explains hypoxia and heterogeneous growth within microbial biofilms associated with chronic infections”, *npj Biofilms Microbiomes*, 2,16012.
- Stoodley, P. Sauer, K. Davies, D.G. Costerton, J.W. (2002): “Biofilms as complex differentiated communities”, *Annu Rev Microbiol*, 56,187-209.
- Stuart, C.H. Schwartz, S.A. Beeson, T.J. Owatz, CB (2006): “Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment”, *J Endod*, 32(2),93-8.
- Sundqvist, G. (1976): “Bacteriological studies of necrotic dental pulps”, *Umeå Univ Odontological Dissertation*, 7,1-93.
- Sundqvist, G.K. Eckerbom, M.I. Larsson, A.P. Sjögren, U.T. (1979): “Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections”, *Infect Immun*, 25(2),685-93.
- Sutherland, I.W. (2001): “The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment”, *Trends Microbiol*, 9(5),222-7.
- Swimberghe, R.C.D. Coenye, T.R.J. De Moor, G. Meire, M.A. (2019): “Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review”, *Int Endod J*, 52(5),604-628.
- Tan, C.H. Lee, K.W. Burmølle, M. Kjelleberg, S. Rice, S.A. (2017): “All together now: experimental multispecies biofilm model systems”, *Environ Microbiol*, 19(1),42-53.

- Tawfik, S.A. Azab, M.M. Ahmed, A.A.A. Fayyad, D.M. (2018): “Illumina MiSeq Sequencing for Preliminary Analysis of Microbiome Causing Primary Endodontic Infections in Egypt”, *Int J Microbiol*, 3,2837328.
- Tulip, D.E. & Palmer, N.O. (2008): “A retrospective investigation of the clinical management of patients attending an out of hours dental clinic in Merseyside under the new NHS dental contract”, *Br Dent J*, 205(12), 659–64.
- Tzanetakakis, G.N. Azcarate-Peril, M.A. Zachaki, S. Panopoulos, P. Kontakiotis, E.G. Madianos, P.N. Divaris, K. (2015): “Comparison of Bacterial Community Composition of Primary and Persistent Endodontic Infections Using Pyrosequencing” *J Endod*, 41(8),1226-33.
- Vademecum (2006): TRUXA ®, <https://mx.prvademecum.com/principio-activo/azitromicina-2536/>, [consultado en 10-11-2019]]
- Vademecum (2018): AMOXICILINA ARDINE Comp. 1000 mg, https://www.vademecum.es/medicamento-amoxicilina%20ardine_273 , [consultado en 21-10-2019]
- van der Waal, S.V. Connert, T. Crielaard, W. de Soet, J.J. (2016): “In mixed biofilms *Enterococcus faecalis* benefits from a calcium hydroxide challenge and culturing”, *Int Endod*, 49(9),865-873
- van der Waal, S.V. de Almeida, J. Krom, B.P. de Soet, J.J. Crielaard, W. (2017): “Diffusion of antimicrobials in multispecies biofilms evaluated in a new biofilm model”, *Int Endod J*, 50(4),367-376.
- Vasudavan, S. Grunes, B. Mcgeachie, J. Sonis, A.L. (2019): “Antibiotic Prescribing Patterns Among Dental Professionals In Massachusetts”, *Pediatr Dent*, 41(1),25-30.
- Vengerfeldt, V. Špilka, K. Saag, M. Preem, J.K. Oopkaup, K. Truu, J. Mändar, R. (2014): “Highly diverse microbiota in dental root canals in cases of apical periodontitis (data of illumina sequencing)”, *J Endod*, 40(11),1778-83
- Walters, M.C. 3rd. Roe, F. Bugnicourt, A. Franklin, M.J. Stewart, P.S. (2003): “Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin”, *Antimicrob Agents Chemother*, 47(1),317-23.
- Wang, Q. Garrity, G.M. Tiedje, J.M. Cole, J.R. (2007): “Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy”, *Appl Environ Microbiol*, 73(16),5261-7.
- Wikiwand (2020): “Colony-forming unit”, https://www.wikiwand.com/en/Colony-forming_unit , [conduktado en 22-01-2020]
- Wittgow, W.C. Jr. (1975): “Sabiston CB Jr. Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps”, *J Endod*, 1(5),168-71.
- Wright, A.J. (1999): “The penicillins”, *Mayo Clin Proc*, 74(3),290-307.
- Yamasaki, M. Kumazawa, M. Kohsaka, T. Nakamura, H. Kameyama, Y. (1994): “Pulpal and periapical tissue reactions after experimental pulpal exposure in rats”, *J Endod*. 20(1),13-7.
- Yan, J. & Bassler, B.L. (2019): “Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms”, *Cell Host Microbe*, 26(1),15-21.
- Zhang, C. Du, J. Peng, Z. (2015): “Correlation between *Enterococcus faecalis* and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review”, *J Endod*, 41(8),1207-13.

Zhang, D. Shen, Y. de la Fuente-Núñez, C. Haapasalo, M. (2019): "In vitro evaluation by quantitative real-time PCR and culturing of the effectiveness of disinfection of multispecies biofilms in root canals by two irrigation systems", *Clin Oral Investig*, 23(2),913-920.

Zhang, J. Wang, Y. Xie, H. Wang, R. Jia, Z. Men, X. Xu, L. Zhang, Q. (2013): "Pharmacokinetics study of amoxicillin and clavulanic acid (8:1)--a new combination in healthy Chinese adult male volunteers using the LC-MS/MS method", *Cell Biochem Biophys*, 65(3),363-72

ANEXOS

Anexo 1. Comité de ética

VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA Vicerectorat
d'Investigació i Política Científica

D. José María Montiel Company, Profesor Contratado Doctor Interino del departamento de Estomatología, y Secretario del Comité Ético de Investigación en Humanos de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que el Comité Ético de Investigación en Humanos, en la reunión celebrada el día 2 de febrero de 2017, una vez estudiado el trabajo fin de máster titulado:
"Generación de biofilm a partir de muestras procedentes de conductos radiculares y el efecto de diferentes antibióticos y de los péptidos de S. dentisani", número de procedimiento H1484736767061, cuyo responsable es D. Álvaro Villanueva Castellote, tutorizado por Dña. Carmen Llena Puy, ha acordado informar favorablemente el mismo dado que se respetan los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y cumple los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Valencia, a tres de febrero de dos mil diecisiete.



Anexo 3. Proporción media de los géneros encontrados en el interior de los conductos radiculares necróticos mediante secuenciación Illumina y Pirosecuenciación.

Género	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	Person et al., 2017	Boullaguet et al., 2018	Iriboz et al., 2018	Tawfi et al., 2018	Santos et al., 2011	Siqueira et al., 2011	Hong et al., 2013	Özok et al., 2013	Tzanetakis et al., 2015	Keşkin et al., 2017
					Illumina MiSeq	Illumina MiSeq	Illumina MiSeq	Illumina MiSeq	Pirosecuenciación	Pirosecuenciación	Pirosecuenciación	Pirosecuenciación	Pirosecuenciación	Pirosecuenciación
<i>Actinobaculum</i>	1,7	1,7	0,2	0,0	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Actinomyces</i>	0,8	14,8	2,4	0,0	7,5	-	-	-	-	-	0,8	14,8	-	1,1
<i>Afipia</i>	1,4	1,4	0,1	0,0	-	-	-	-	-	-	1,4	-	-	-
<i>Agrobacterium</i>	5,9	8,6	1,4	0,0	-	-	5,9	-	-	-	-	-	8,6	-
<i>Aggregatibacter</i>	4,2	4,2	0,4	0,0	-	-	4,2	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alloprevotella</i>	2,0	3,0	0,7	0,0	2,4	3,0	-	-	-	-	-	-	2,0	-
<i>Anaeroglobus</i>	1,3	1,3	0,1	0,0	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Anaerovorax</i>	1,6	1,6	0,2	0,0	-	-	-	-	-	-	-	1,6	-	-
<i>Atopobium</i>	1,1	6,9	1,9	0,5	6,9	2,7	1,1	-	-	-	1,9	-	6,8	-
<i>Bacillus</i>	5,1	5,1	0,5	0,0	-	-	5,1	3,2	-	-	5,3	-	17,9	-
<i>Bacteroides</i>	3,2	20,5	5,7	4,1	-	5,1	20,5	-	-	5,0	-	-	-	-
<i>Bulleidia</i>	1,1	1,1	0,1	0,0	-	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter</i>	1,3	1,3	0,1	0,0	-	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Capnocytophaga</i>	1,9	1,9	0,2	0,0	-	-	-	-	-	-	1,9	-	-	-
<i>Caulobacter</i>	0,1	0,1	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-
<i>Clostridium</i>	1,3	1,3	0,1	0,0	-	-	1,3	-	-	-	-	-	-	-
<i>Corynebacterium</i>	1,5	1,5	0,2	0,0	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dialister</i>	0,9	4,7	1,3	0,5	1,6	3,4	4,7	-	-	-	0,9	-	2,8	-
<i>Enterococcus</i>	0,8	2,0	0,3	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	2,0
<i>Erysipelotrichaceae</i>	0,9	0,9	0,1	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9	-
<i>Eubacterium</i>	0,8	12,0	2,1	0,0	-	-	-	-	12,0	-	0,8	1,9	6,6	-
<i>Filifactor</i>	1,2	1,5	0,4	0,0	1,4	-	-	-	-	-	-	1,2	1,5	-
<i>Freribacterium</i>	0,5	3,6	0,4	0,0	-	3,6	-	-	-	-	-	-	0,5	-
<i>Fusobacterium</i>	2,1	15,9	6,3	5,2	7,2	15,9	-	-	-	15,0	6,7	2,1	3,6	12,6
<i>Lachnospiraceae</i>	0,8	1,2	0,2	0,0	-	-	-	-	-	-	0,8	1,2	-	-
<i>Lactobacillus</i>	0,6	11,7	3,5	0,3	11,2	1,7	-	-	-	-	-	11,7	0,6	9,6
<i>Lautropia</i>	1,0	1,0	0,1	0,0	-	-	-	-	-	-	1,0	-	-	-
<i>Leptotrichia</i>	4,3	4,3	0,4	0,0	4,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mogibacterium</i>	0,7	1,9	0,4	0,0	-	1,7	-	-	-	-	0,7	1,9	-	-

Anexo 3. Proporción media de los géneros encontrados en el interior de los conductos radiculares necróticos mediante secuenciación Illumina y Pirosecuenciación.

Género	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	Person et al., 2017	Boulliguet et al., 2018	Írthoz et al., 2018	Tawfi et al., 2018	Santos et al., 2011	Siqueira et al., 2011	Hong et al., 2013	Özok et al., 2013	Tzanetakis et al., 2015	Keskin et al., 2017
<i>Moraxella</i>	1,5	2,3	0,4	0,0	-	1,5	-	-	-	-	-	-	2,3	-
<i>Methanobrevibacter</i>	1,0	1,0	0,1	0,0	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Methylobacterium</i>	1,3	1,3	0,1	0,0	-	-	1,3	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mycoplasma</i>	0,9	8,6	0,9	0,0	-	-	8,6	-	-	0,9	-	-	-	-
<i>Neisseria</i>	0,3	14,0	2,0	0,0	-	-	-	-	-	4,8	-	0,9	0,3	14,0
<i>Novosphingobium</i>	8,0	8,0	0,8	0,0	-	-	-	-	-	8,0	-	-	-	-
<i>Olsenella</i>	1,2	1,9	0,4	0,0	1,4	1,9	-	-	-	-	-	-	1,2	-
<i>Orbacterium</i>	0,8	2,0	0,4	0,0	-	2,0	-	-	-	-	-	0,8	1,3	-
<i>Paludibacter</i>	7,4	7,4	0,7	0,0	-	-	7,4	-	-	-	-	0,8	-	-
<i>Parascardovia</i>	0,8	0,8	0,1	0,0	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-
<i>Parvimonas</i>	1,6	12,1	2,6	0,0	1,6	8,1	-	-	-	-	-	3,8	-	12,1
<i>Peptostreptococcus TM7</i>	0,4	2,7	0,6	0,0	1,4	2,7	-	-	-	-	-	1,8	0,4	-
<i>Phocaeicola</i>	3,5	12,5	1,6	0,0	3,5	-	-	-	12,5	-	-	-	-	-
<i>Porphyromonas Prevotella</i>	1,5	16,8	3,8	3,0	2,7	5,7	3,3	3,6	-	5,0	1,5	6,1	-	16,8
<i>Protonibacterium</i>	5,7	23,5	8,9	7,6	12,7	5,7	5,8	17,2	-	9,0	1,3	9,1	-	23,5
<i>Pseudoramibacter</i>	0,2	16,6	1,9	0,0	1,2	-	-	-	-	16,6	1,3	0,2	-	-
<i>Pyramitobacter</i>	1,1	10,0	3,1	2,2	1,6	2,8	-	10,0	-	8,0	1,1	3,5	4,5	-
<i>Rastonia</i>	2,9	13,4	2,5	0,0	2,9	6,4	-	-	-	13,4	-	10,5	0,1	-
<i>Rothia</i>	0,1	6,0	0,6	0,0	-	-	-	-	-	6,0	-	-	0,1	-
<i>Schwarzia</i>	0,8	0,8	0,1	0,0	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-
<i>Selemomonas</i>	1,0	1,0	0,1	0,0	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Solobacterium</i>	1,2	1,4	0,3	0,0	1,2	-	-	-	-	-	-	1,4	-	-
<i>Sphaerochaeta</i>	0,8	0,8	0,1	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-
<i>Sphingobium</i>	1,2	1,2	0,1	0,0	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sphingomonas</i>	1,2	1,2	0,1	0,0	-	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-
<i>Synergistes</i>	0,7	0,7	0,1	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-
<i>Syntrophomonadaceae</i>	1,1	1,1	0,1	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1
<i>Streptococcus</i>	1,4	1,4	0,1	0,0	-	-	-	-	-	-	-	1,4	-	-
<i>Tannerella</i>	0,6	9,4	3,1	2,1	4,4	-	-	3,5	-	5,7	7,0	0,6	-	9,4
<i>Treponema</i>	1,3	4,8	0,8	0,0	-	1,3	4,8	-	-	-	-	-	1,8	-
<i>Veillonella</i>	0,8	3,2	0,7	0,4	1,0	3,2	-	-	-	0,8	-	1,3	1,2	-
	0,8	2,9	0,5	0,0	1,4	-	-	-	-	-	-	2,9	0,8	-