



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**MICROBIOMA ENDODÔNTICO**

Trabalho submetido por  
**Catarina Gonçalves Pinto Teixeira**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**Outubro de 2015**



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **MICROBIOMA ENDODÔNTICO**

Trabalho submetido por  
**Catarina Gonçalves Pinto Teixeira**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Professor Doutor Nuno Taveira**

**Outubro de 2015**



## **Dedicatória**

Quero dedicar este trabalho ao meu falecido avô que não teve oportunidade de me ver formar neste curso.



## **Agradecimentos**

Quero agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Nuno Taveira, por toda a sua ajuda e disponibilidade durante todo este processo.

Quero agradecer a todos os meus colegas e amigos que me auxiliaram de alguma forma neste processo, nomeadamente à Mafalda Mendonça, Carlota Neto, Ricardo Góis, João Cruz e ao João Oliveira.

Quero agradecer à minha família, sobretudo às minhas tias e à minha prima Ana Palma, que sempre demonstraram preocupação com a evolução do meu trabalho.

Quero agradecer ao meu namorado por todo o apoio e incentivo nos momentos mais difíceis.

Quero agradecer ao meu irmão Diogo, que mesmo estando longe, esteve sempre pronto a ajudar-me de todas as formas possíveis.

Por fim, quero agradecer às pessoas mais importantes da minha vida, o meu Pai e a minha Mãe, que me deram tudo o que teve ao alcance de ambos para a minha formação e sobretudo todo o amor que me dão todos os dias. Um eterno obrigado.



## **Resumo**

A endodontia estuda as patologias da polpa, do sistema dos canais radiculares e dos tecidos periapicais. Esta especialidade odontológica está estreitamente relacionada com a microbiologia uma vez que as infecções endodônticas são provocadas por microrganismos que alteram o equilíbrio do sistema polpa-raiz-dente. A heterogeneidade fenotípica e genética confere aos microrganismos uma capacidade de adaptação ao hospedeiro que se reflete num potencial patogénico único.

Através dos métodos moleculares modernos de identificação e caracterização dos microrganismos, mais evoluídos que os tradicionais dependentes de cultura, conhece-se hoje muito mais sobre o Microbioma endodôntico. Por exemplo, sabe-se hoje que existe uma multiplicidade bacteriana superior e um perfil mais diversificado da comunidade bacteriana nas infecções endodônticas persistentes *versus* infecções primárias e, também, que a microbiota do mesmo dente varia em complexidade e diversidade consoante a localização apical ou coronal.

Graças aos avanços nas técnicas de diagnóstico microbiológico tem-se conseguido otimizar as decisões médicas sobre o tratamento endodôntico apropriado no sentido de controlar e eliminar a infeção.

Neste trabalho efetua-se uma revisão sobre o estado da arte da etiologia, patogénese, diagnóstico e tratamento das infecções endodônticas microbianas.

**Palavras-chave:** Microbioma; Infecções endodônticas; Métodos de diagnóstico microbiológico; Sistema polpa-raiz-dente



## **Abstract**

Endodontics studies the diseases of the pulp, root canal system and periapical tissues. This dental specialty is closely related with microbiology since endodontic infections are caused by microorganisms that modify the tooth-pulp-root system equilibrium. The phenotypic and genetic heterogeneity confers to this microorganisms a mechanism for adaptation to the host which is reflected in an unique pathogenic potential.

Today, the knowledge regarding endodontic microbiome is far superior, thanks to advanced molecular methods used in isolation and identification of microorganisms as opposed to the traditional ones which required cultivation. We know now that there is far more variety of microorganisms species on persistent endodontic infections than on primary ones, also on the same tooth the microbiota complexity and diversity is dependent on the apical versus coronal location of the infection.

Thus, advances in microbiological diagnostic techniques have contributed to optimize medical decisions regarding endodontic treatment effective on the control and elimination of infection.

On this paper we have made a revision on the state of the art of the etiology, pathogenesis, diagnostic and treatment of microbiological endodontic infections.

**Keywords:** Microbiome; Endodontic infections; Microbiological diagnostic methods; Dental-pulp-root system



## Índice Geral

I. Introdução.....	17
II. Desenvolvimento .....	19
1. Infecções endodônticas.....	19
2. Patogenia das infecções endodônticas.....	21
3. Técnicas de colheita e diagnóstico microbiológico das infecções endodônticas .....	23
3.1. Cultura .....	24
3.2. Amostragem .....	26
3.3. Microscopia .....	28
3.4. Métodos imunológicos .....	30
3.5. Métodos de biologia molecular .....	31
4. Infecções intra-radulares primárias .....	35
5. Infecções intra-radulares secundárias e persistentes .....	43
6. Infecções extra-radulares.....	47
7. Tratamento.....	51
8. Microrganismos presentes após tratamento endodôntico.....	53
III. Conclusão .....	55
IV. Bibliografia.....	57



## Índice de Abreviaturas

A

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ARN – Ácido Ribonucleico

E

EDTA – Ácido Tetraacético Etilenodiamino

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

F

FISH – Hibridização Fluorescente *In Situ*

I

ISO - *International Standards Organization*

P

PCR – Reação de Polimerização em Cadeia



## Índice de Figuras

Figura 1 - Digitalização obtida através do CSEM do material de obturação extruído, observado no ápex radicular, não removido após retratamento endodôntico.....	29
Figura 2 - Distribuição dos filótipos bacterianos encontrados em infecções endodônticas através de métodos de cultura, moleculares e ambos .....	31
Figura 3 - Fluxograma simples do método FISH .....	34
Figura 4 - Abundância relativa dos diversos filos bacterianos na periodontite periapical aguda e crônica .....	37
Figura 5 - Frequência de detecção/ níveis de espécies bacterianas e filótipos na periodontite apical crônica.....	39
Figura 6 - Frequência de detecção das espécies bacterianas em infecções primárias nas diferentes localizações do dente .....	40
Figura 7 - Comparação da abundância dos 10 taxa bacterianos detetados em dentes previamente obturados de doentes assintomáticos e assintomáticos.....	45
Figura 8 - Molar maxilar com lesão periapical extra-radicular .....	47
Figura 9 - Características clínicas e imagiológicas de um abscesso apical agudo difuso e aspetos do seu tratamento. ....	51



## I. Introdução

O termo Microbioma Humano refere-se à comunidade ecológica de todos os microrganismos comensais, simbióticos e patogênicos que se alojam no corpo que têm um papel determinante na saúde e na doença (Dewhirst et al., 2010).

O Microbioma oral é composto por mais de 600 espécies predominando em diferentes habitats. A cavidade oral é um sistema complexo que alberga estruturas como a língua, os dentes, o sulco gengival, a mucosa jugal, o palato duro e mole e as amígdalas, colonizadas por diversos microrganismos desde bactérias, vírus, fungos (Dewhirst et al., 2010).

O equilíbrio do Microbioma oral é conseguido pela interação de três elementos fundamentais: microrganismos, hospedeiro e fatores ambientais. As condições patológicas como as cáries e as doenças periodontais ocorrem quando esta sinergia é quebrada (José F. Siqueira, Fouad, & Rôças, 2012).

Mais de 50% das espécies que habitam a cavidade oral não poderiam ser cultivadas utilizando métodos convencionais. As técnicas moleculares têm sido usadas para identificar alterações na flora oral durante o crescimento e o desenvolvimento, durante a gravidez, em vários materiais restauradores e no edentulismo. São usadas também para estudo da microflora periodontal e infecções periapicais, da bacteriemia após extração de dentes, de peri-implantites, da influência dos terceiros molares na inflamação periodontal, de candidíase e infecções faciais raras como o noma (Flynn, Paster, Stokes, Susarla, & Shanti, 2012).



## **II. Desenvolvimento**

### **1. Infecções endodônticas**

A polpa dentária é um tecido conjuntivo que se encontra no interior da câmara pulpar e que comunica com a zona periapical através do forâmen apical. A porção coronal do dente está revestida por esmalte e a porção radicular pelo cimento. A constituição e integridade do esmalte e da dentina têm a função de proteger a polpa e constituir uma barreira física que impede a sua distensibilidade. Por outro lado a polpa apresenta uma limitada comunicação vascular e nervosa através do forâmen apical com o resto do organismo. Este facto aliado à ausência de circulação colateral eficaz determina uma dificuldade evidente da resolução de todos os quadros inflamatórios que ocorrem na polpa (Fransson, 2012).

As infecções endodônticas são uma das causas mais regulares de perda precoce de peças dentárias, infecções localizadas/ generalizadas das estruturas dentárias e dor oro-facial. A periodontite apical afeta 50% da população até aos 50 anos de idade e 62% dos indivíduos com mais de 60 anos (Figdor & Gulabivala, 2011). A etiologia destas infecções é polimicrobiana e pode ter origem nas cáries profundas e superficiais ou até mesmo nas bactérias do periodonto. Estas infecções podem tomar proporções muito graves na medida em que um conjunto de microrganismos diferenciados invade um espaço estéril e se desenvolve protegido das influências exteriores (Hsiao et al., 2012).

Os organismos quando invadem estes espaços estéreis, como a polpa, multiplicam-se e iniciam a sua atividade patogénica que, por sua vez, é dependente da resposta do hospedeiro (Lato et al., 2011). A resposta do hospedeiro à agressão microbiana baseia-se primeiramente pelo depósito de dentina terciária, com o objetivo de prevenir o acesso dos microrganismos ao tecido pulpar. Dentro da polpa, nas primeiras etapas da infeção, pode existir uma resposta inflamatória aguda mas, posteriormente, ocorre uma resposta inflamatória crónica com reações imunitárias associadas (Mohammadi, Palazzi, Giardino, & Shalavi, 2012).

As lesões cáries se não forem atempadamente diagnosticadas e tratadas podem alastrar-se até à dentina e rapidamente atingir a polpa causando uma infeção e posterior necrose pulpar. A microbiota presente em infeções endodônticas consiste primeiramente por bactérias anaeróbias proteolíticas. Se a infeção persistir depois do tratamento,

normalmente são encontrados microrganismos que não estão presentes habitualmente na cavidade oral sã (Wade, 2013).

## 2. Patogenia das infecções endodônticas

Ao contrário de outras localizações da cavidade oral, não existe nenhuma microflora autóctone endodôntica, isto é, todos os microrganismos presentes no interior dos canais radiculares infetados são agentes patogénicos oportunistas: tanto podem ser bactérias orais comensais associados a uma cavidade oral sã ou a bactérias patogénicas relacionadas com uma cavidade oral comprometida devido a doenças como a cárie dentária ou a doença periodontal (L. Li et al., 2010).

A colonização da câmara pulpar pelas bactérias está maioritariamente relacionada com as cáries: através dos túbulos dentinários, as bactérias invadem e multiplicam-se dentro da polpa. Como os túbulos têm de 0,9 a 4 micrómetros de diâmetro e as bactérias têm 0,2 a 0,7 micrómetros, a via de proliferação está facilitada sobretudo na ausência de esmalte ou cimento. A invasão dá-se mais rapidamente em dentes não vitais do que em vitais (Dige, Grønkjær, & Nyvad, 2014). Em dentes vitais, o movimento para o exterior do fluido dentinário e a própria constituição dos túbulos influenciam a permeabilidade, podendo consideravelmente atrasar a invasão intratubular pelas bactérias (Andreasen & Kahler, 2015). Desta forma, enquanto a polpa está vital, o facto de a dentina estar exposta não é uma via significativa de infeção pulpar, a não ser que esta se encontre notavelmente reduzida (aumenta exponencialmente a sua permeabilidade). Por outro lado se a polpa se encontrar necrótica, os túbulos dentinários expostos permitem mais facilmente a entrada e a posterior colonização pelas bactérias (Fransson, 2012).

A exposição direta da polpa à cavidade oral é a causa mais óbvia de uma infeção endodôntica. Apesar da cárie ser a causa principal de exposição pulpar, os microrganismos podem atingir a polpa através da exposição direta devido a traumas ou a procedimentos restauradores iatrogénicos. O intervalo de tempo entre a exposição pulpar e a infeção dos canais é imprevisível mas usualmente é um processo moroso. Comparando as duas formas, a cárie é uma doença crónica que pode levar à exposição pulpar bacteriana num prazo que pode oscilar entre meses a anos, enquanto uma exposição mecânica direta permite o acesso bacteriano imediato à polpa embora a quantidade e a diversidade bacteriana seja claramente inferior sobretudo se for usado o dique durante o tratamento (José F. Siqueira & Rôças, 2007).

A doença periodontal pode ser uma via de infeção endodôntica uma vez que nos tecidos periodontais, os microrganismos dos biofilmes subgingivais podem alcançar a

polpa através dos túbulos dentinários ou através de canais laterais. Contudo, como já foi referido, o movimento para o exterior do fluido dentinário em geral protege a polpa, e só ocorre infeção e necrose pulpar se a bolsa periodontal atingir o forâmen apical. Se este facto se verificar, pode levar à danificação irreversível dos vasos que atravessam o forâmen apical. Assim que a polpa necrosa, os organismos periodontais podem chegar aos canais radiculares via ramificações, túbulos dentinários expostos e forâmen apical despoletando um processo infeccioso (Graunaite, Lodiene, & Maciulskiene, 2011).

A anacorese é o mecanismo pelo qual as bactérias podem colonizar e infetar a polpa através da circulação. Não obstante, para que a infeção se desenvolva tem de existir um processo inflamatório no tecido pulpar que incapacite os mecanismos de defesa e que por outro lado existam as condições necessárias para a invasão microbiana. Não existe, no entanto, nenhuma evidência direta que este processo represente uma via para as infeções nos canais radiculares. A via principal para as infeções pulpares em lesões traumáticas envolve o sulco gengival, através da exposição da dentina por fraturas no esmalte ou por lesão da microvascularização do ligamento periodontal (Dezan, Holland, Consolaro, Ciesielski, & Jardim, 2012).

### 3. Técnicas de colheita e diagnóstico microbiológico das infecções endodônticas

A necessidade de identificar, caracterizar e enumerar os microrganismos endodônticos patogênicos evidenciou-se quando se descobriu que as infecções periapicais eram causadas por microrganismos específicos. A adequação e eficácia dos métodos de diagnóstico tem influenciado a escolha do tratamento adequado, nomeadamente o agente anti-microbiano para ser usado no tratamento da infecção. Para fazer a identificação dos microrganismos patogênicos específicos ao nível da espécie são necessários elevados gastos económicos e temporais e, por vezes, acaba por ser impossível visto que muitos membros da microflora oral não estão ainda suficientemente caracterizados (Procop, 2007).

Tradicionalmente, o diagnóstico bacteriológico era baseado em abordagens convencionais e cultivo-dependentes como os métodos de cultura e contagem acoplados à caracterização morfológica e fisiológica. Hoje em dia, os rápidos avanços tecnológicos dos métodos de identificação bacteriana estão a permitir a deteção, identificação e diferenciação de novas estirpes bacterianas através das técnicas recentemente implementadas (Weile & Knabbe, 2009).

Reconhecendo a importância da comunidade microbiana como agente patogénico torna-se imprescindível desenvolver investigações que permitam a identificação da estrutura e fisiologia de todas as espécies microbianas. Muitos métodos moleculares estão a ser aplicados para investigação dos microrganismos associados com as infecções endodônticas, incluindo técnicas para identificação como PCR seguido por uma análise de biblioteca de clones e métodos de hibridização do ADN. As técnicas para criar um perfil microbiano são usadas sobretudo quando se quer uma impressão digital de toda a comunidade como DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (José F. Siqueira & Rôças, 2009a).

### 3.1. Cultura

Cultura é o processo de propagação de microrganismos em laboratório através do fornecimento de condições favoráveis ao seu desenvolvimento. Os ingredientes podem advir de sistemas de vida naturais ou artificiais. Para que eles se multipliquem são necessárias condições específicas como os nutrientes, temperatura, humidade, atmosfera, pH, entre outras. Para elaborar a cultura são tiradas amostras para o laboratório num meio anaeróbio viável. Depois são dispersos/ misturados no vortex, são distribuídos em vários tipos de meios de agar, e é feita a sua cultura em meio aeróbio ou anaeróbio. Após o tempo de incubação, das colónias individuais são feitas novas subculturas e identificadas baseadas nos seus múltiplos aspetos, incluindo a morfologia celular e da colónia, o padrão da coloração de gram, tolerância do oxigénio, caracterização bioquímica, e análise do produto final por cromatografia líquida (Del Fabbro, Samaranayake, Lolato, Weinstein, & Taschieri, 2014).

O perfil proteico da membrana celular exterior analisada através de eletroforese, fluorescência por luz ultra violeta e testes de suscetibilidade a antibióticos específicos podem ser também uma boa aposta para a identificação de espécies. Existem também disponíveis kits comercializados que testam enzimas pré-formadas, como por exemplo o sistema automatizado Vitek (bioMérieux) e o sistema API (bioMérieux). Estes *kits* são usados para identificar com rapidez algumas espécies embora possam apresentar baixa precisão para identificação de muitos anaeróbios, que requerem mais ensaios. As vantagens e limitações dos métodos de cultura estão descritas abaixo (Nair, 2009).

#### Vantagens:

- Amplo alcance, permite a identificação de espécies inesperadas
- Quantificação da maior parte dos microrganismos viáveis nas amostras
- Determinação da suscetibilidade antimicrobiana dos isolados
- Permite estudos fisiológicos
- Permite estudos patogenicidade

## Desvantagens:

- Impossibilidade de cultura de um grande número de espécies bacterianas existentes
- Nem todas as bactérias viáveis podem ser recuperadas
- Após serem isoladas, as bactérias necessitam de identificação através de várias técnicas
- Identificação incorreta de estirpes com comportamento fenotípico ambíguo
- Baixa sensibilidade
- Alta dependência do modo de transporte da amostra
- Técnicas de isolamento caras, morosas e trabalhosas
- Amostras necessitam de processamento imediato
- Equipamento especializado e específico para isolar anaeróbios restritos
- Especificidade dependente da experiência do microbiologista

Antigamente, resultados de métodos tradicionais subestimavam o número de taxas bacterianas presente nos canais infetados devido à impossibilidade de cultivar a maior parte da microbiota endodôntica. Estudos culturo-dependentes demonstraram que as infecções primárias endodônticas eram caracterizadas por uma comunidade mista dominada por bactérias anaeróbicas composta por 2,6 a 5,4 taxa por canal (I. N. Rôças & Siqueira, 2008). Num estudo que analisava a microbiota dos canais radiculares de infecções endodônticas primárias através de ensaios de hibridização “*reverse-capture checkerboard*”, os resultados obtidos foram de 14 taxa por canal, um valor bastante superior ao descrito anteriormente (Tzanetakis et al., 2015).

Devido às limitações dos métodos de identificação baseados na cultura, novas técnicas têm sido desenvolvidas de forma a identificar os microrganismos sem a utilização de técnicas de cultura (José F. Siqueira et al., 2012).

### 3.2. Amostragem

Como é sabido, a periodontite apical é causada pelos microrganismos que se alojam nos canais radiculares e o tratamento deve incluir a remoção da causa, isto é, a erradicação bacteriana. Os protocolos de tratamento que incluem o isolamento, a preparação do canal com irrigantes antimicrobianos, a medicação intracanal e a reabilitação final, são dirigidos à eliminação dos agentes patogênicos. Os protocolos de tratamento são baseados em dados recolhidos por amostragem microbiológica do canal radicular (MRS). Assim o MRS, Microbiological Root Canal Sampling, é a base da endodontia clínica (Tennert et al., 2013) (Anderson et al., 2013) (Tzanetakakis et al., 2015).

Os resultados obtidos através do MRS têm sido amplamente utilizados na endodontia clínica/prática para o diagnóstico clínico. As vantagens principais da utilização do MRS é a redução do tamanho da amostra, duração, custo e dificuldades sentidas durante os estudos. O ponto negativo é que este procedimento pode não ser suficiente para prever o resultado eficaz do tratamento (Sathorn, Parashos, & Messer, 2007).

Independentemente da técnica de amostragem, as amostras devem ser processadas no laboratório num prazo de 4 horas após a colheita (Alsunaien, Pratten, Ng, Gulabivala, & Ready, 2010).

Após o isolamento do dente com o dique de borracha, o dente e toda a zona envolvente deve ser desinfetada com peróxido de hidrogénio a 30% e descontaminada com uma solução de hipoclorito de sódio a 3%. Depois do acesso à cavidade com as brocas estéreis, os canais que vão servir de amostra não podem estar secos, têm ter humidade que pode ser conferida com 5mL de uma solução salina estéril. Esta propriedade é extremamente importante para que a colheita dos microrganismos com os cones de papel seja bem-sucedida. Se a câmara pulpar contiver líquido, este deve ser removido também através dos cones de papel ou através de pellets de esponja estéreis (Tennert et al., 2013).

A técnica mais usada para a amostragem utiliza normalmente 3 ou 4 cones de papel estéreis ISO 25 ou 30 dentro dos canais 1mm inferior ao comprimento estimado através da radiografia. O cone deve ficar cerca de 1 minuto no canal enquanto se efetuam movimentos curtos de inserção e desinserção, da zona principal para a área pulpar, para gerar uma suspensão bacteriana. A colheita da zona dos cones de papel

embebidos deve ser feita sem contacto de possíveis contaminantes exteriores. De seguida estes devem ser imediatamente colocados em microtubos estéreis com 0,75 a 2mL de RTF (*reduced transport fluid*) para proteção da amostra contra a oxidação. Esta técnica é repetida para cada cone. Para evitar falsos negativos e aumentar a precisão da amostragem, podem ser usados pellets impregnados de carvão (Haapasalo, Udnæs, & Endal, 2003) (Anderson et al., 2012) (Tennert et al., 2013) (Ricucci, Siqueira, Lopes, Vieira, & Rôças, 2015).

Quando se trata de um caso agudo, como o abscesso apical agudo, em que os tecidos moles estão afetados, faz-se uma aspiração. No caso de um retratamento, primeiro o material de obturação deve ser retirado e só de seguida o protocolo de MRS pode ser aplicado. Todavia, o canal não pode ter restos de agentes desinfetantes e o retratamento não pode ser feito com o uso do clorofórmio (evitar falsos-negativos) (Ozbek, Ozbek, & Erdorgan, 2009).

### 3.3. Microscopia

Um exame microscópico direto representa um rápido fácil e barato meio de seleção de amostras microbianas para os principais tipos morfológicos e padrões de coloração. Por outro lado, descobertas sobre a morfologia microbiana através do microscópio podem ser ilusórias. Este facto deve-se ao pleomorfismo das espécies podendo levar a conclusões influenciadas por interpretações subjetivas do próprio investigador (Wilson & Bacic, 2012).

Uma outra limitação desta técnica está relacionada com a sensibilidade restrita e específica para detetar microrganismos em amostras clínicas. Esta fraca sensibilidade deve-se à quantidade enorme de células microbianas que são necessárias das amostras antes de serem analisadas microscopicamente. Alguns microrganismos podem até precisar determinadas colorações ou necessitar diferentes abordagens para se tornarem visíveis. A especificidade limitada deve-se à dificuldade de distinguir espécies (Wilson & Bacic, 2012).

A microscopia eletrónica tem sido usada para análise e caracterização de biofilmes em infeções humanas e dispositivos médicos. A microscopia que recorre a feixes eletrónicos tem um poder de resolução 400x maior que os microscópios óticos (Su, Gao, Yu, Wang, & Yu, 2010).

O CSEM (conventional scanning electron microscope) faz a digitalização de imagens de uma amostra através de um feixe de eletrões. Este método é muito útil uma vez que tem a capacidade de discriminação da topografia de superfície de um biofilme em alta resolução e amplificação (figura 1). No entanto, esta técnica não permite a visualização ou examinação *in situ* de estratégias terapêuticas endodônticas uma vez que a amostra final, pode não preservar o seu estado nativo (Schaudinn et al., 2009). O CSEM combinado com FISH é muitas vezes usado em estudos que pretendem identificar a presença de bactérias e da arquitetura dos biofilmes de dentes extraídos após o insucesso do tratamento endodôntico (Ricucci & Siqueira, 2010).

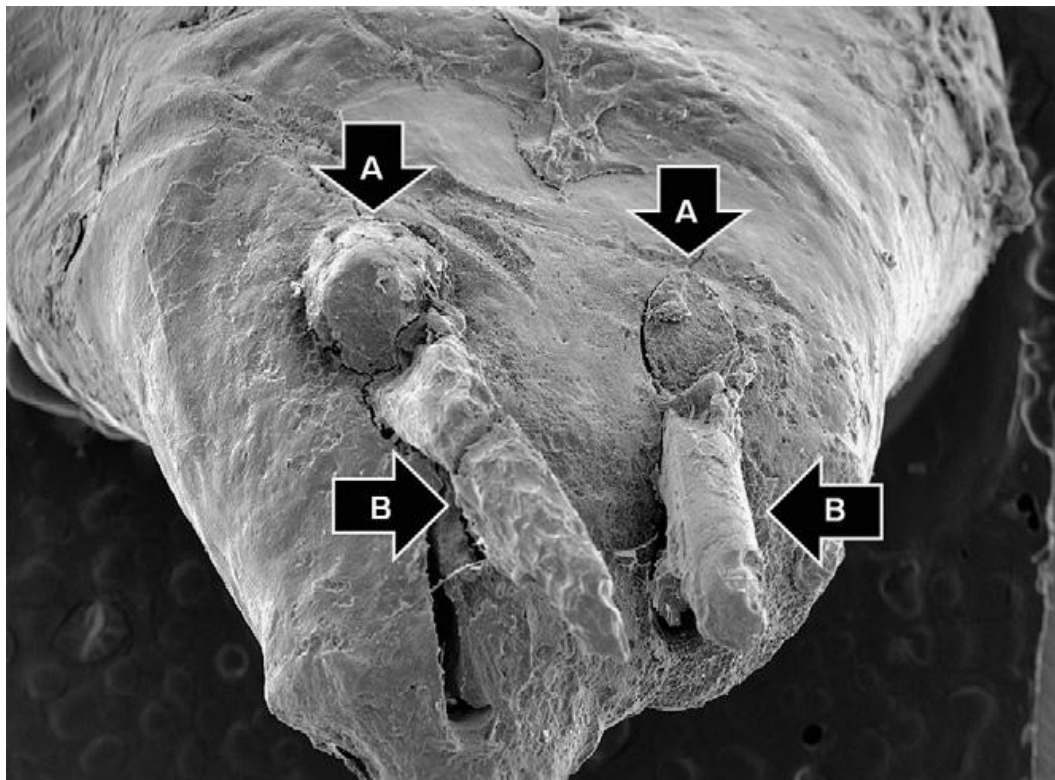
O ESEM (environmental electron microscope) tem a vantagem de fazer a transmissão de imagem de tecidos e bactérias dos canais radiculares sem alterações do seu estado nativo apesar de perder resolução (Mohammadi et al., 2012).

O TEM (transmission electron microscope) exige o mesmo tipo de preparação que o CSEM, envolvendo um processamento laboratorial complexo e demorado. Este emite um feixe de eletrões que atravessa a amostra. A utilização do TEM em conjunto

com corantes polissacáridos específicos permite aos investigadores identificar a natureza das fibras extracelulares dos biofilmes endodônticos e elucidar a sua correlação com as células (Mohammadi et al., 2012).

O CLSM (confocal laser scanning microscope) permite examinar biofilmes *in situ* sem as limitações do SEM, apesar de apresentar uma baixa ampliação. CLSM está a ser utilizado para determinar a verdadeira constituição da placa e a localização exacta das bactérias no biofilme. A utilização do CLSM implica tingir os organismos com corantes fluorescentes. Estes emitem luz em comprimentos de onda específicos, permitem sondar determinadas funções celulares e ainda fazer a quantificação e ver a viabilidade celular (Mohammadi et al., 2012).

Investigações *in situ* que recorreram à microscopia eletrónica, mais concretamente às técnicas descritas anteriormente, permitiram a observação de bactérias do sistema canal de infeções primárias e secundárias/persistentes, isto é à observação de biofilmes sésseis que cobrem as paredes de dentina dos dentes com patologias periapicais (Mohammadi et al., 2012).



**Figura 1 - Digitalização obtida através do CSEM do material de obturação extruído, observado no apéx radicular, não removido após retratamento endodôntico. (A) Material de obturação após retratamento não cirúrgico do canal radicular. (B) Material de obturação pré-existente que extruiu através do foramén apical durante a re-obturação (Signoretti et al., 2011)**

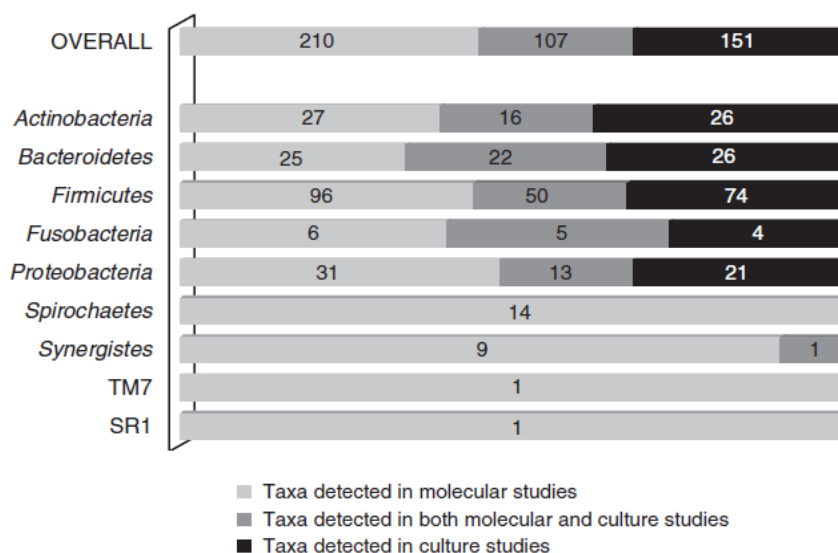
### 3.4. Métodos imunológicos

Os métodos imunológicos recorrem a anticorpos que reconhecem antígenos microbianos específicos que fazem a detecção de espécies-alvo. Este método acaba por ser rápido, facilmente padronizado, baixo custo e detecta microrganismos não vivos. Similarmente como em todas as técnicas, os métodos baseados na imunologia também têm as suas limitações: baixa sensibilidade, a sua especificidade é variável, apenas detecta espécies-alvo e está dependente do tipo de anticorpo utilizado (Peciulienė, Maneliene, Balcikonyte, Drukteinis, & Rutkunas, 2008) (Weile & Knabbe, 2009).

Estudos imunológicos permitiram entender a importância da imunobiologia da periodontite apical mais especificamente no conhecimento sobre as endotoxinas e a sua habilidade de ativar células imunes. Num estudo em que foram utilizados métodos imunológicos (ELISA) associados a métodos moleculares, foi demonstrado que as espécies bacterianas gram-negativas estão envolvidas nas infeções primárias e que as endotoxinas têm uma correlação determinante na sintomatologia e na destruição do osso alveolar. Os ensaios imunológicos são raramente utilizados em estudos endodônticos visto que há métodos mais úteis e específicos, como o PCR e a pirosequenciação (Martinho, Leite, Nascimento, Cirelli, & Gomes, 2014).

### 3.5. Métodos de biologia molecular

Estes métodos, projetados para detetar ADN microbiano, têm sido amplamente usados para criar perfis das comunidades bacterianas em variados meios/ambientes. Uma das grandes vantagens relaciona-se com a capacidade de inclusão de bactérias ainda não cultivadas (José F. Siqueira & Rôças, 2009b) (Figura 2).



**Figura 2 - Distribuição dos filótipos bacterianos encontrados em infecções endodônticas através de métodos de cultura, moleculares e ambos (J F Siqueira & Rôças, 2009a)**

#### 3.5.1. Reação de Polimerização em cadeia (PCR)

Este método é baseado na replicação *in vitro* do ADN através de ciclos repetitivos de desnaturação, hibridização dos primers e várias etapas de extensão realizadas em termocicladores. O ADN alvo serve como molde e desnatura a temperaturas elevadas criando 2 cadeias simples de ADN. O resultado é uma amplificação exponencial dos fragmentos de ADN que confere uma extrema sensibilidade para detetar o ADN-alvo (Sibley, Peirano, & Church, 2012).

A forma mais usada para analisar é através da eletroforese em gel de agarose que faz a divisão dos produtos de ADN por tamanho e carga. Esta é a técnica mais simples (Garibyan & Avashia, 2013).

Uma limitação do PCR é o facto de esta técnica não fazer a distinção de ADN de células mortas ou viáveis e continua por ser revelado se os resultados deste método representam verdadeiramente a flora endodôntica viva autêntica ou em vez disso um

historial de organismos que entraram dentro do canal e não sobreviveram no seu interior. É importante também referir que as amostras clínicas para análise do PCR requerem o mesmo método como para a cultura: colocar os cones de papel dentro do conduto de forma a estes ficarem embebidos com a amostra, portanto estas técnicas estão igualmente suscetíveis a contaminações que podem dar resultados falsos positivos e ou negativos (Rahman, Uddin, Sultana, Moue, & Setu, 2013).

Várias modificações da técnica PCR convencional foram desenvolvidas ao longo do tempo, consoante as necessidades. As mais usadas são *Broad-Range PCR*, *Real-Time PCR*, *Reverse Transcriptase PCR*, *Multiplex PCR* e *Touchdown PCR*.

O PCR é usado na maioria dos estudos endodônticos para investigar a microbiota dos canais radiculares infetados permitindo alargar conhecimentos sobre as bactérias envolvidas na patogénese das doenças periapicais, como por exemplo, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Dialister pneumosintes*, e *Prevotella tanneriae*. Estas espécies foram detetadas através da análise PCR, pela primeira vez, nos canais radiculares em dentes com periodontite apical e com uma prevalência superior aos estudos moleculares (José F. Siqueira & Rôças, 2013).

#### *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)*

Na DGGE os fragmentos de ADN com o mesmo comprimento e com sequências nucleotídicas diferentes são separados por géis de poliacrilamida que contêm um gradiente linearmente crescente de desnaturação de ADN. Atualmente é possível comparar a estrutura de uma comunidade microbiana em múltiplas e diferentes amostras e acompanhar as alterações das populações microbianas ao longo do tempo, incluindo após tratamento antimicrobiano (José F Siqueira, Rôças, & Rosado, 2005).

Uma das aplicações da DGGE em pesquisas endodônticas é no estudo das diferenças da composição bacteriana dominantes nas infeções periapicais sintomáticas (agudas) e assintomáticas (crónicas) e também estudos que fazem a comparação das estruturas das comunidades bacterianas em dentes obturados com e sem periodontite apical (Zoletti et al., 2010).

### 3.5.2. ADN-ADN hibridização

ADN-ADN hibridização é um procedimento que utiliza sondas de ADN para alcançar todo o ADN genómico ou genes específicos, como o 16S. A partir de um grande número de amostras de ADN faz-se hibridização com sondas ADN numa única membrana que tem função de suporte, permitindo a deteção de múltiplos ADN numa única ou em várias amostras. O método *checkerboard* permite que simultaneamente se determine a presença de múltiplas espécies bacterianas numa amostra ou em várias amostras clínicas (Del Fabbro et al., 2014).

A vantagem deste método, comparativamente aos métodos de cultura-dependentes, é a identificação de espécies ou estirpes bacterianas difíceis/impossíveis de cultivar e por este motivo, os resultados de vários estudos são divergentes (J F Siqueira, Rôças, Souto, de Uzeda, & Colombo, 2010). Vários estudos que recorreram a este método molecular conseguiram evoluir consideravelmente no ramo da microbiologia das infeções endodônticas (J F Siqueira et al., 2010).

### 3.5.3. Pirosequenciação

É um método de sequenciação do ADN baseado no princípio “sequenciação por síntese”: cada nucleótido introduzido pela ADN polimerase resulta na libertação de um pirofosfato que inicia uma série de reações em cadeia que produzem luz. A quantidade de luz produzida é proporcional ao número de nucleótidos incorporados. As suas vantagens assentam no potencial de precisão, flexibilidade, processamento paralelo e facilidade de automatização. Ao sequenciar regiões de genes hipervariáveis bem caracterizadas como a ARNr 16S, os dados da sequência fornecem informações inequívocas e discriminatórias (tipos e estirpes) para a identificação microbiana (Del Fabbro et al., 2014).

Para além de ser utilizado para pesquisar os diferentes meios, esta tecnologia tem sido também aplicada à análise da microbiota humana associada à saúde e à doença, incluindo a cavidade oral (José F. Siqueira, Alves, & Rôças, 2011). Esta técnica permite o acesso a bactérias pouco abundantes nos canais radiculares infetados e demonstra diversidade bacteriológica da microflora endodôntica previamente inacessível como por exemplo os filo *Tenericutes* (0.68%), *Deinococcus-Thermus* (0.16%), *Chloroflexi*

(0.10%), *Cyanobacteria* (0.01%), *ODI* (0.003%), e *Acidobacteria* (0.001%) (L. Li et al., 2010).

### 3.5.4. Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH)

O método FISH baseia-se na ligação complementar entre uma sonda fluorescente marcada e o gene alvo, combinando a precisão da genética molecular com a informação visual do microscópio (Bottari, Ercolini, Gatti, & Neviani, 2006). Esta técnica dá informações sobre a presença, quantidade, morfologia, organização e distribuição espacial do microrganismo. A precisão e a fiabilidade depende das sondas selecionadas. A baixa intensidade do sinal pode ser causada pela insuficiente penetração da sonda dentro da célula bacteriana (Del Fabbro et al., 2014).

Como as sondas nucleotídicas podem ser feitas mesmo para este propósito, esta técnica permite não só a detecção de espécies microbianas já cultivadas como também microrganismos ainda não cultivados, acabando por ser uma grande vantagem. O protocolo deste método (figura 3) inclui fixação e permeabilização da amostra, hibridização das respectivas sondas que vão detetar as sequências alvo, lavagem para retirar sondas que não se ligaram e detecção das células etiquetadas por microscopia ou citometria de fluxo (Tronstad & Sunde, 2013). Esta técnica em conjunto com o CLSM permite, por exemplo, a visualização e identificação das bactérias dentro das lesões periapicais dos canais radiculares infetados (J F Siqueira & Rôças, 2005).

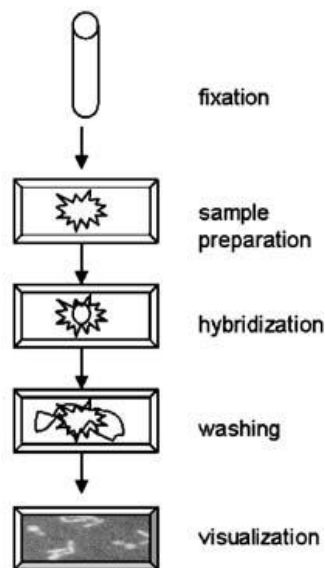


Figura 3 - Fluxograma simples do método FISH (Bottari et al., 2006)

#### 4. Infecções intra-radiculares primárias

As infecções endodônticas resultam da infecção de todo o sistema dos canais radiculares e são o principal agente etiológico da periodontite apical. A infecção endodôntica desenvolve-se após a necrose pulpar devido a sequelas de cárie, trauma, doença periodontal ou procedimentos iatrogênicos, sendo as condições ambientais do canal radicular propícias para a infecção (J F Siqueira & Rôças, 2009a).

Os perfis bacteriológicos da microbiota endodôntica são individuais na medida que cada indivíduo possui uma microbiota exclusiva em termos de riqueza (número de diferentes representantes ao nível da espécie) e abundância (número de bactérias de cada espécie). Este facto indica que a periodontite apical primária não tem uma etiologia específica uma vez que várias combinações de espécies despoletam esta doença (Ribeiro, Matarazzo, Favari, Zezell, & Mayer, 2011). Existem cerca de 10 a 30 espécies por canal, maioritariamente anaeróbias, num total de  $10^3$  a  $10^8$  células por canal infetado (Isabela N. Rôças & Siqueira, 2010).

Os fatores necessários para que a infecção primária ocorra são: o potencial redox, a disponibilidade nutricional e o pH intra-canal. As bactérias anaeróbias facultativas são muitas vezes encontradas nas fases iniciais da infecção pois o seu desenvolvimento neste meio é favorável. Apesar do seu primeiro recurso energético ser os hidratos de carbono, dentro do canal não existe este macronutriente em abundância devido à inexistência de comunicação direta com a cavidade oral. Este facto limita a oportunidade de crescimento para os anaeróbios facultativos. Ao longo das fases da infecção, as glicoproteínas e as proteínas endógenas tornam-se os nutrientes essenciais dentro dos canais, formados a partir da degradação de restos de polpa e do influxo de exsudados dos tecidos periapicais que se encontram dentro dos canais, devido ao processo inflamatório. O metabolismo bacteriológico deste exsudado faz com que dentro o canal ocorra redução do potencial redox e o pH esteja aumentado, levando ao crescimento de bactérias anaeróbicas estritas (Peciulienė et al., 2008).

Os métodos de biologia molecular têm causado um grande impacto no conhecimento sobre a diversidade das espécies nas infecções endodônticas. Para reforçar e confirmar algumas espécies associadas previamente à periodontite apical foram usados outros métodos moleculares: PCR quantitativo em tempo real. Exemplos como *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* foram

encontradas com uma maior abundância do que já teria sido reportado em estudos anteriores (Blome, Braun, Sobarzo, Molecular, & Jepsen, 2008).

As bactérias encontradas nas infecções primárias encontram-se distribuídas em sete filo principais: *Firmicutes* (57,1%), *Bacteroidetes* (18,8%), *Proteobacteria* (8,6%), *Actinobacteria* (7,14%), *Synergistetes* (4,3%), *Fusobacteria* (2,9%) e *Spirochaetes* (1,4%). Excluindo apenas as *Spirochaetes*, os seis restantes filo compreendem 96% da microbiota oral (Ribeiro et al., 2011). Dentro do filo *Firmicutes* destacam-se as duas classes *Clostridia* e *Negativicutes* e as espécies mais abundantes do filo *Bacteroidetes* são a *Tannerella forsythia* e *Prevotella oris* (Ribeiro et al., 2011).

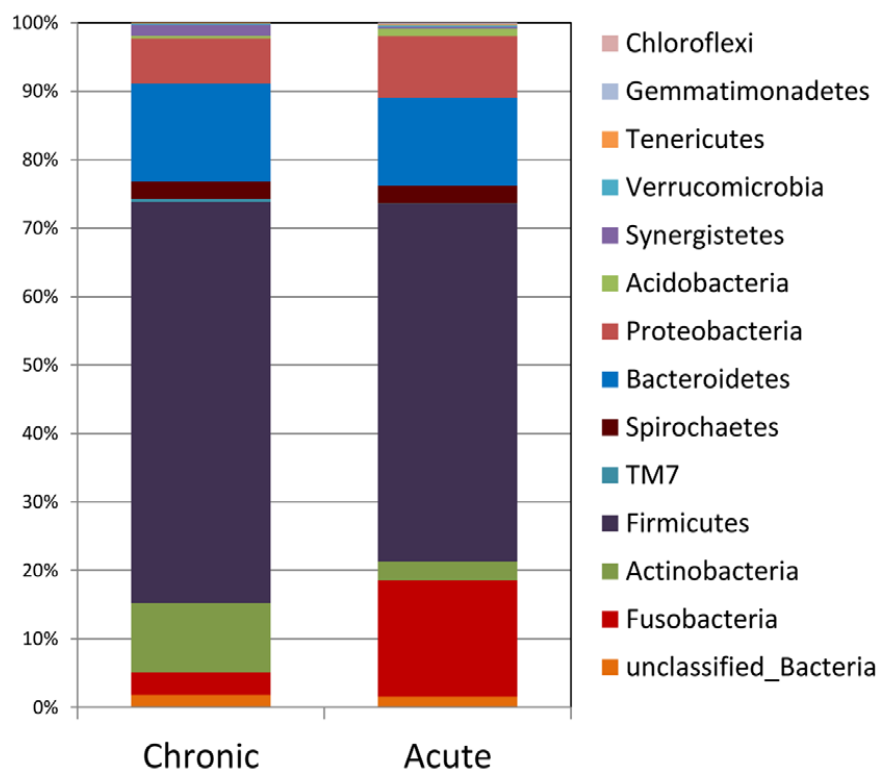
Em termos de espécies, as que são mais frequentemente encontradas nas infecções primárias quer na periodontite apical aguda (sintomática) ou crônica (assintomática) pertencem ao grupo das bactérias gram-negativas (*Fusobacterium*, *Dialister*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella*, *Treponema*, *Campylobacter* e *Veillonella*) e das gram-positivas (*Parvimonas*, *Filifactor*, *Pseudoramibacter*, *Olsenella*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Eubacterium* e *Propionibacterium*) (Ricucci & Siqueira, 2010a).

O tamanho da lesão apical da periodontite é proporcional ao número de espécies diversas encontradas dentro do canal (Ricucci & Siqueira, 2010a).

Várias espécies novas difíceis de cultivar têm sido incluídas no conjunto de organismos endodônticos patogênicos somente após o aparecimento de novas técnicas moleculares para identificação. Num estudo, foram extraídos 10 dentes de pacientes diferentes com lesões periapicais crônicas e foi usada a técnica de pirosequenciação do ADN codificante do ARNr 16S para análise da microbiota apical e alguns exemplos encontrados foram *Tannerella forsythia*, *Dialister invisus*, *Dialister pneumosintes*, *Prevotella baroniae*, *Filifactor alocis*, *Olsenella uli* e *Treponema spp* (José F. Siqueira et al., 2011).

Segundo um estudo, que tinha como objetivo comparar a diversidade bacteriológica das periodontites apicais agudas das crônicas, 90% do microbioma era constituído por *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria* (Santos et al., 2011). O método utilizado foi a pirosequenciação do ADN codificante do ARNr 16S e permitiu a detecção de 916 espécies de bactérias diferentes, pertencentes a 67 géneros. No total foram detetados 13 filios: na periodontite apical aguda os mais abundantes foram *Firmicutes* (52%), *Fusobacteria* (17%) e *Bacteroidetes* (13%), do mesmo modo que na periodontite apical crônica os filo mais

abundantes foram *Firmicutes* (59%) logo seguidos de *Bacteroidetes* (14%) e *Actinobacteria* (10%) (ver figura 4). Em termos de prevalência (número total de casos existentes), membros de *Firmicutes* foram encontrados em todos os casos; *Fusobacteria* foi detetada com maior prevalência nas periodontites agudas (89%) do que nas crônicas (50%); *Bacteroidetes* ocorreram em 78% nas periodontites apicais agudas e 87,5% nas crônicas enquanto os representantes da *Actinobacteria* ocorreram em 78% na periodontite apical aguda e 62,5% na periodontite apical crônica.



**Figura 4 - Abundância relativa dos diversos filos bacterianos na periodontite periapical aguda e crônica** (Santos et al., 2011)

As espécies mais prevalentes na periodontite apical aguda por ordem decrescente eram *Treponema denticola* (75% dos casos), *Pseudoramibacter alactolyticus* (60% dos casos), *Tannerella. forsythia* (58% dos casos), *Porphyromonas endodontalis* (50% dos casos), *Porphyromonas gengivalis* (50% dos casos), *Propionibacterium propionicum* (50% dos casos), *Treponema maltophilum* (50% dos casos) e *Treponema socranskii* (42% dos casos). Na periodontite apical crônica destacaram-se as espécies *Pseudoramibacter alactolyticus* (76% dos casos), *Porphyromonas endodontalis* (61% dos casos), *Treponema denticola* (57% dos casos),

*Dialister pneumosintes* (57% dos casos), *Filifactor alocis* (57% dos casos), *Tannerella forsythia* (54% dos casos) e *Treponema socranskii* (39% dos casos) (Santos et al., 2011).

Estes dados permitem concluir que existe uma diversidade bacteriológica enorme no que toca às periodontites apicais agudas e crónicas, não sendo possível atribuir apenas a um género ou a um filo a presença de sintomatologia (J F Siqueira & Rôças, 2005).

Num estudo que tinha em vista identificar as espécies mais comuns na periodontite apical crónica, amostras de 43 dentes de pacientes diferentes com esta patologia foram analisadas para a presença e abundância de 83 espécies/filótipos orais através de técnicas de hibridização “*reverse-capture checkerboard*” (I. N. Rôças & Siqueira, 2008). Os resultados deste estudo encontram-se na figura 5, que apresenta a frequência de deteção e níveis relativos de espécies bacterianas e filótipos em amostras retiradas de dentes com periodontite apical crónica, em que o comprimento da barra indica a prevalência das espécies e as sombras dentro das barras indicam os diferentes níveis de espécies.

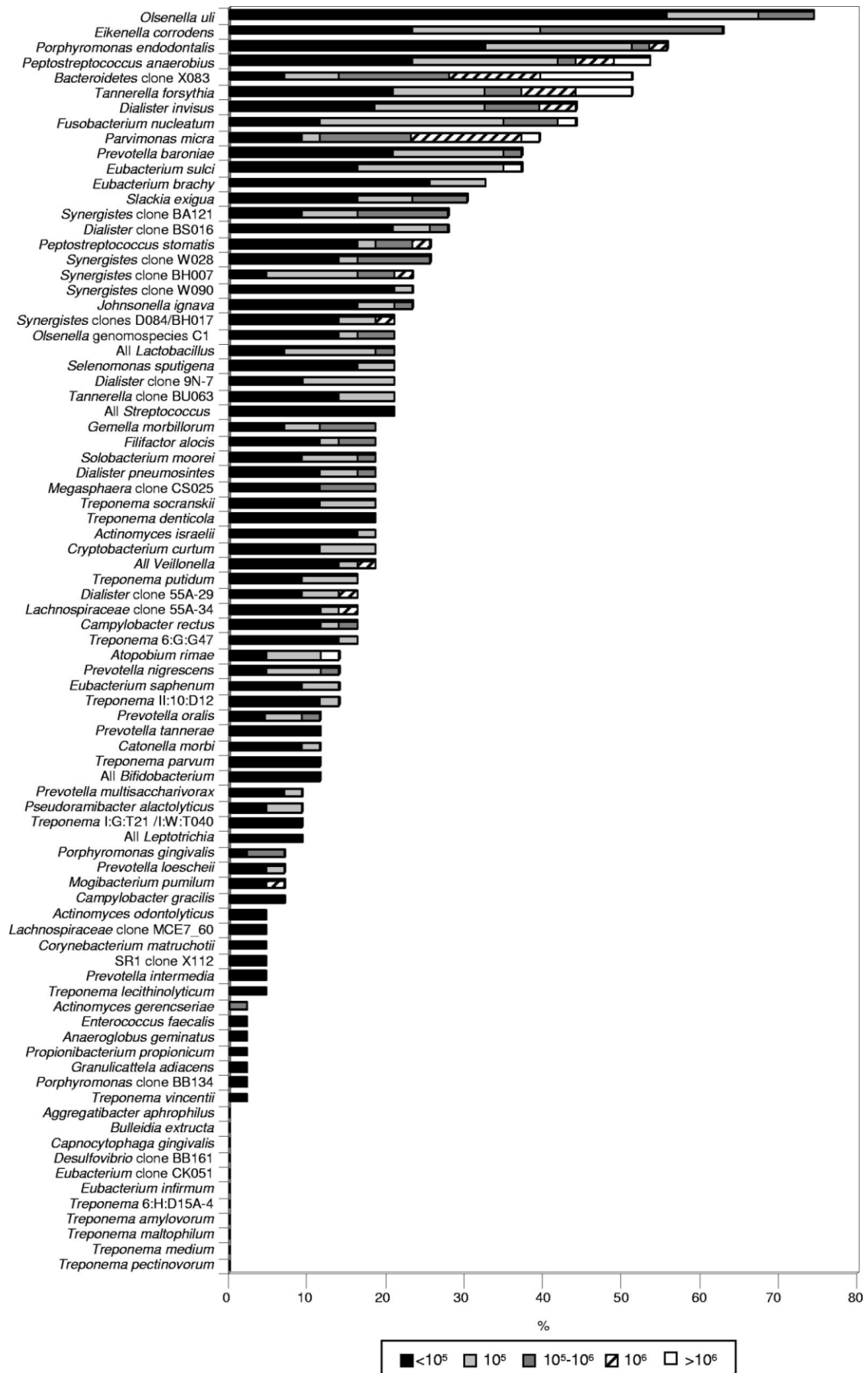


Figura 5 - Frequência de detecção/ níveis de espécies bacterianas e filótipos na periodontite apical crônica (I. N. Rôças & Siqueira, 2008)

Recentemente foi feito um estudo que comparou pela primeira vez a complexidade do microbioma endodôntico de infecções primárias de amostras retiradas do mesmo dente de diferentes localizações da raiz (zona apical e zona coronal) (Isabela N. Rôças, Alves, Santos, Rosado, & Siqueira, 2010). Os resultados demonstraram que os segmentos apicais da raiz têm um nicho próprio muito mais diversificado e complexo que a zona coronal. Os anaeróbios estritos estavam presentes numa maior proporção na zona apical do que na zona coronal dos segmentos da raiz. Na zona mais coronal foram encontrados sobretudo *Streptococcus spp*, e no segmento apical da raiz *Prevotella baroniae*, *Tannerella forsythia* e *Fusobacterium nucleatum*. Na figura 6, pode-se observar a frequência de detecção das espécies bacterianas de amostras das zonas apicais, médias e coronais dos canais radiculares do mesmo dente, em pacientes diferentes, com periodontite apical primária, em que o comprimento de cada barra indica a prevalência geral das espécies independentemente da zona estudada e as cores indicam a prevalência da taxa bacteriana específica de cada localização.

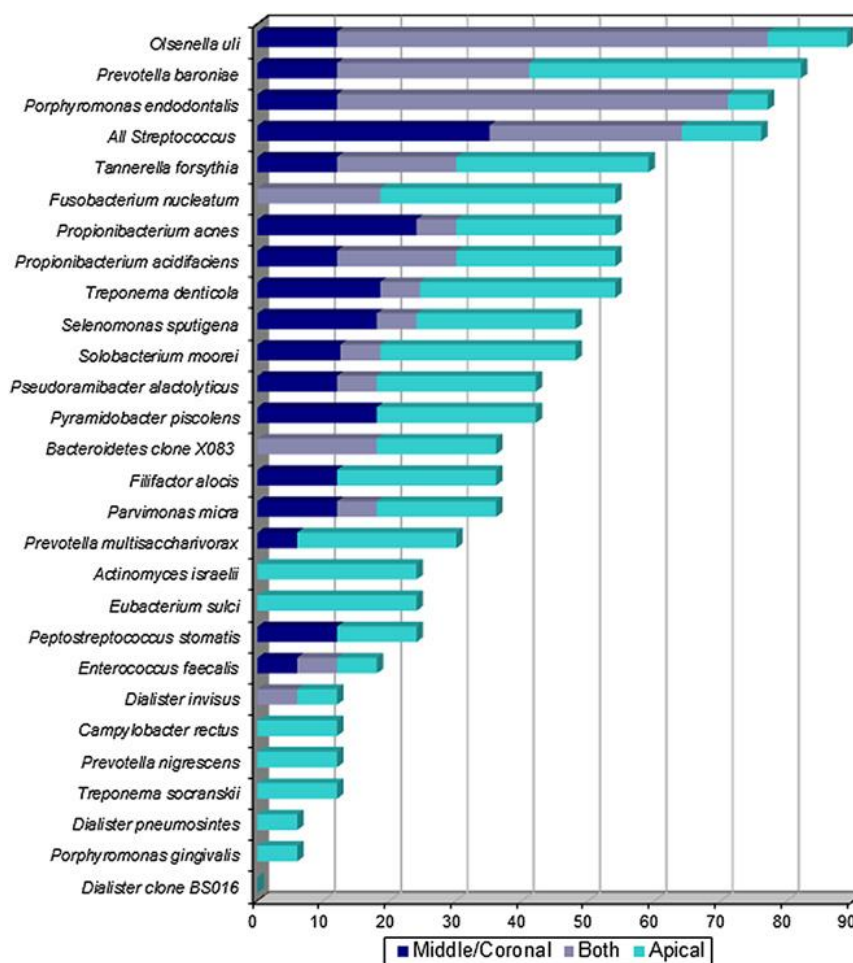


Figura 6 - Frequência de detecção das espécies bacterianas em infecções primárias nas diferentes localizações do dente (Isabela N. Rôças et al., 2010)

Num outro estudo com o mesmo objetivo, dois dos anaeróbios que eram mais abundantes no segmento apical pertenciam ao género *Faecalibacterium* (*Firmicutes*, família *Ruminococcaceae*) e a membros ainda não classificados da família *Ruminococcaceae* (Özok et al., 2012).

A nível apical predominam portanto microrganismos anaeróbios estritos e o tempo da infeção tem uma forte influência, isto é, quanto mais tempo estiver a infeção a decorrer mais anaeróbios estarão presentes (Özok et al., 2012).

Para além das bactérias, outros microrganismos podem ser encontrados ocasionalmente nas infeções intra-radulares. Incluem-se aqui os fungos que foram apenas registados esporadicamente em infeções primárias: *Candida albicans*, *Geotrichum spp*, *Rhodoforula spp* e *Saccharomyces spp* (José F. Siqueira & Rôças, 2009b) (Anderson et al., 2012).

O domínio *Archae*, que compreende um grande grupo de procariotas distinto do *Bacteria*, não possui agentes patogénicos para o Homem. No entanto num estudo, a prevalência de *Archae* em infeções endodônticas primárias foi cerca de 38%, um valor algo elevado que não se verificou em estudos anteriores nem posteriores (Jiang, Xia, Li, Jiang, & Liang, 2009).

Os vírus necessitam de células hospedeiras para se replicarem e por isso não conseguem sobreviver no canal radicular com a polpa necrótica e, por esta razão, apenas são detetados em canais radulares de dentes com polpas vitais. O vírus da imunodeficiência humana (VIH) foi detetado em pacientes seropositivos com polpas vitais não inflamadas e alguns herpes vírus, como o citomegalovírus (HCMV) foram identificados em polpas vitais com ou sem inflamação. O citomegalovírus (HCMV) e o Epstein-Barr vírus (EBV) foram detetados em tecidos periapicais inflamados, incluindo lesões sintomáticas periodontais apicais e abscessos. O impacto dos vírus na patogénese da pulpite e periodontite apical é ainda desconhecido (H. Li, Chen, Chen, Baumgartner, & Machida, 2009) (Jakovljevic & Andric, 2014).

O abscesso apical agudo é uma das condições mais frequentemente tratada em procedimentos endodônticos de emergência. Clinicamente pode ser caracterizado por dor espontânea, sensibilidade à percussão, dor à palpação e potencial difusão para os seios e outros espaços da cabeça e do pescoço provocando celulites (Montagner, Gomes, & Kumar, 2010). A microbiota relacionada é mista e sobretudo anaeróbica com cerca de 12-18 taxa bacteriana por caso comparando com os casos crónicos (7-12). As taxa mais frequentemente encontradas incluem *Fusobacterium nucleatum* (64% dos

casos), *Parvimonas micra* (previamente *Peptostreptococcus/ Micromonas micros*) (52% dos casos), *Porphyromonas endodontalis* (48% dos casos), *Olsenella uli* (45% dos casos), *Streptococcus spp* (38% dos casos), *Eikenella corrodens* (38% dos casos), *Prevotella baroniae* (36% dos casos) e *Treponema denticola* (36% dos casos) (J F Siqueira & Rôças, 2009b).

Recentemente, a análise molecular revelou que em termos de diversidade, 24% a 46% das taxa encontradas pertencem a filótipos não cultiváveis. Em termos de abundância, coletivamente somente representam desde 6% a 30% dos clones sequenciados. Um exemplo destes dados é o filótipo do filo *Bacteroidetes* conhecido como clone oral X083 que já foi encontrado numa frequência de 14 a 36% em amostras aspiradas de abscessos (José F. Siqueira & Rôças, 2013a).

Num estudo mais recente sobre o abscesso apical agudo que recorreu a vários métodos nomeadamente cultura, ADN-ADN hibridização, PCR e DGGE, foram detetadas as bactérias *Corynebacterium spp.*, *Streptococcus mitis*, *Actinomyces naeslundii*, *Propionibacterium acnes*, *Bacteroides spp* e *Veillonella spp* associadas a esta patologia. (Al-Omari & Al-Samahi, 2014).

## 5. Infecções intra-radulares secundárias e persistentes

As infecções intra-radulares secundárias são causadas por microrganismos que estão ausentes nas infecções primárias mas que foram introduzidos dentro do canal radular durante o tratamento endodôntico em consultório. Pelo contrário, as infecções persistentes são causadas por microrganismos que fizeram parte da infecção primária ou secundária que persistiram dentro do canal após o tratamento e que acabaram por se adaptar às condições agrestes nos canais instrumentados e preenchidos. As infecções secundárias e persistentes são responsáveis por graves problemas na prática médica endodôntica, incluindo exsudação persistente, sintomas recorrentes, *flare-ups* (intensificação aguda de uma patologia periapical após o início do tratamento endodôntico) e falha do tratamento endodôntico. Exceto quando o tratamento endodôntico falha, existem poucos estudos na literatura sobre as infecções secundárias intra-radulares que tenham consistentemente encontrado os mesmos microrganismos associados a estas condições clínicas. Por outro lado, existem alguns casos reportados que mostram que bactérias não provenientes da flora oral podem estar associadas às infecções secundárias com exsudado persistente ou com sintomatologia dolorosa (Tzanetakis et al., 2015).

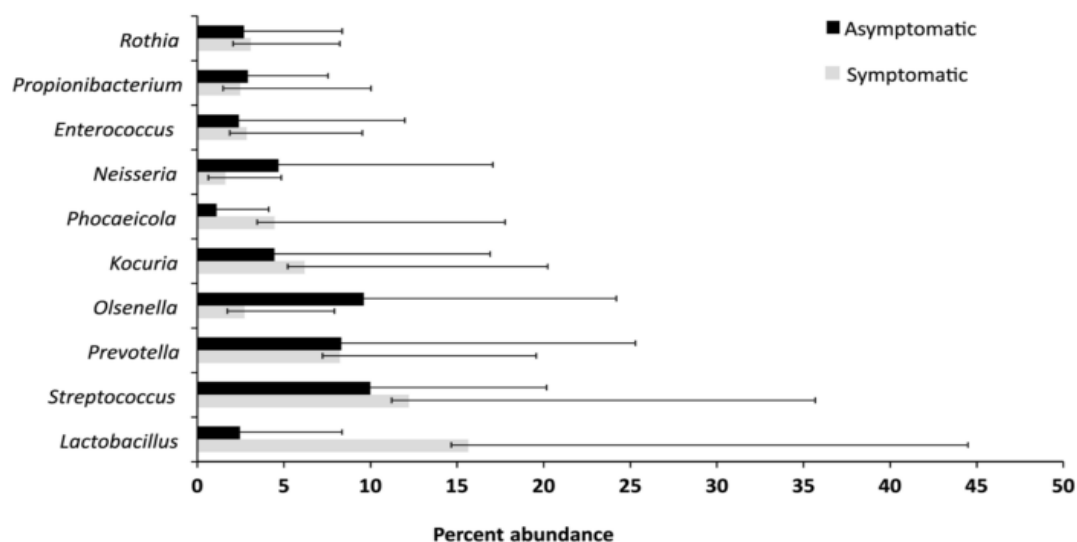
A microbiota relacionada com os tratamentos endodônticos falhados tem sido bastante estudada. A relação entre os microrganismos e o resultado do tratamento é suportada por argumentos baseados em duas evidências: as bactérias estão presentes no momento de obturar os canais aumentando o risco de insucesso do tratamento e quase todos os canais obturados evidenciando lesões da periodontite apical persistente são devidos à infecção intracanal não resolvida (José F. Siqueira & Rôças, 2009b).

Num estudo em que objetivo era comparar os microrganismos persistentes durante as fases do tratamento endodôntico, que combinou duas técnicas, RT-PCR e a técnica de hibridização “*reverse-capture checkerboard*”, concluiu-se que no geral, os grupos taxonômicos mais prevalentes foram *Streptococcus spp* (47%), *Fusobacterium nucleatum* (40%), *Olsenella uli* (33%), *Propionibacterium acnes* (27%), *Porphyromonas endodontalis* (27%) e *Peptostreptococcus stomatis* (27%) (Isabela N. Rôças & Siqueira, 2010).

Os fungos, apesar de não estarem frequentemente associados às infecções primárias, parecem estar presentes nas infecções intra-radulares secundárias. *Candida albicans* é a que ocorre na maior parte das infecções radulares e é potencialmente

patogénica. Outras espécies encontradas são *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida inconspicuous* e *Geotrichum candidum* (Gomes, Fidel, Fidel, & de Moura Sarquis, 2010). Estudos que recorreram a métodos baseados em cultura reportaram uma prevalência da *Candida albicans* de 3 a 6% enquanto que outros estudos baseados em PCR encontraram este fungo presente em 21% dos casos (Mistry, Sanghvi, & Parmar, 2011). Alguns compostos, como a clorhexidina digluconato, hidróxido de cálcio (numa mistura com clorhexidina ou paraminoclorofenol) e EDTA podem ser aplicados no interior dos canais em pacientes em que há suspeita de infeção fúngica (Gomes et al., 2010).

Num estudo metagenómico recente sobre infeções secundárias endodônticas sintomáticas e assintomáticas em dentes obturados, foram encontrados 14 filótipos bacterianos nas amostras radiculares (Anderson et al., 2013). O filo mais abundante foi *Firmicutes* (30%), seguido de *Proteobacteria* (26%), *Actinobacteria* (23%), *Bacteroidetes* (13%) e *Fusobacteria* (5%). Foram ainda detetados, pela primeira vez os seguintes filótipos: *TM7*, *Deinococcus-Thermus*, *Cyanobacteria*, *Chloroflexi*, *SRI* e *ODI*. No geral foram detetados cerca de 270 géneros, e os mais abundantes foram *Streptococcus* (11%), *Prevotella* (8%), *Lactobacillus* (8%), *Kocuria* (5%), *Neisseria* (3%) e *Enterococcus* (3%). As infeções agudas apresentaram uma percentagem maior de *Firmicutes* (30%) e *Fusobacteria* (7%) comparativamente com as assintomáticas (23% e 3%) e menor de *Proteobacteria* (17%) e *Actinobacteria* (19%) do que as crónicas (33% e 26%, respetivamente). As diferenças mais relevantes neste estudo foram no filo *Proteobacteria*. O género *Streptococcus*, estava presente em todos os casos sintomáticos e em 91% dos casos assintomáticos. Este estudo, demonstrou existir uma clara distinção na composição bacteriana das infeções endodônticas secundárias agudas ou crónicas (Anderson et al., 2013). A figura 7 mostra a abundância em percentagem dos 10 taxa bacterianos mais representativos do estudo em questão, em que as amostras de dentes de doentes assintomáticos estão a preto e os sintomáticos a cinzento.



**Figura 7 - Comparação da abundância dos 10 taxa bacterianos detetados em dentes previamente obturados de doentes assintomáticos e assintomáticos. As barras correspondem ao desvio padrão da média (Anderson et al., 2013)**

Num outro estudo em que o objetivo era comparar técnicas de cultura-dependente e independente (sequenciação do ADN codificante do ARNr 16S) para analisar a microflora radicular de dentes obturados com lesões periapicais, foram encontradas pela primeira vez as seguintes bactérias em infecções radiculares secundárias/persistentes: *Enterococcus gallinarum/casseliflavus*, *Lactobacillus gasseri*, *Olsenella profusa*, *Proteus hauseri/vulgaris*, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Phocaeicola abscessus*, *Pantoea agglomerans* e *Delftia spp* (Anderson et al., 2012).

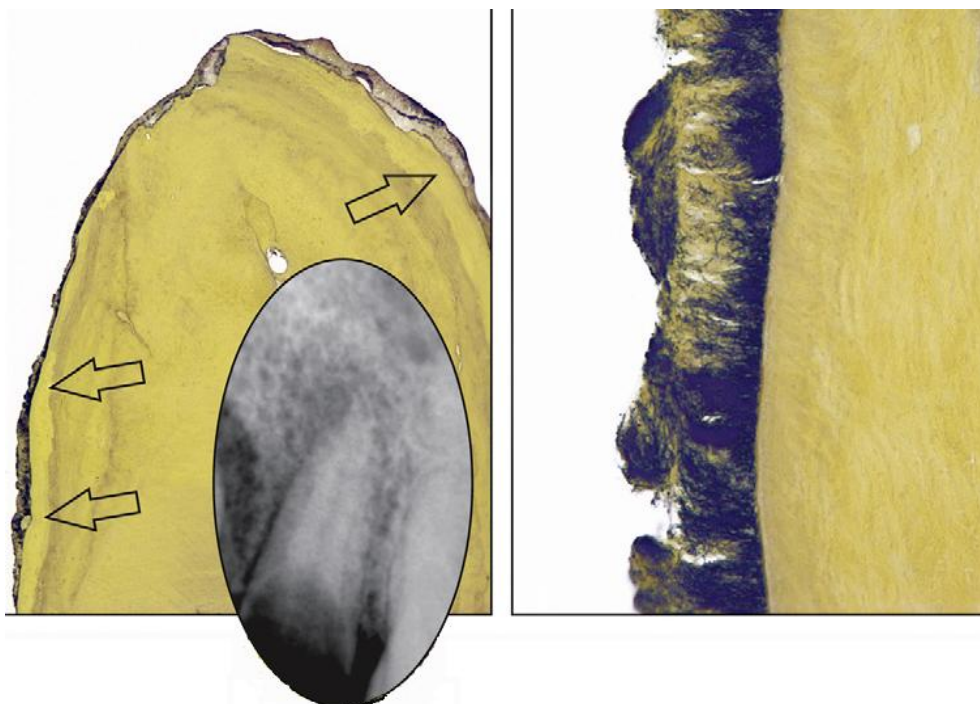
Este estudo permitiu detetar novas bactérias potencialmente patogénicas nos canais radiculares obturados após lesão periapical contribuindo assim para demonstrar que a análise filogenética de sequências genómicas permite caracterizar melhor a diversidade da microflora radicular do que os métodos baseados em cultura (Anderson et al., 2012).



## 6. Infecções extra-radiculares

A barreira entre a microbiota e as defesas do hospedeiro está na maior parte das vezes localizada intra-radicularmente. Em alguns casos, por outro lado, os microrganismos conseguem passar essa barreira de defesa e atingem os tecidos periapicais passando a infecção para a zona extra-radicular (J F Siqueira & Rôças, 2009a).

Tradicionalmente, existia a ideia que o sistema intra-canal e os túbulos dentinários das raízes abrigavam os microrganismos infetados, enquanto a zona extra-radicular das lesões periodontais crônicas era livre de bactérias devido à defesa do hospedeiro que impedia que as bactérias invadissem o peri-ápex. Hoje em dia, existem evidências que as bactérias de facto colonizam o espaço extra-radicular. Geralmente a zona extra-radicular refere-se à parte sólida ligada à superfície do canal radicular que termina no foramén apical do ápex da raiz. Apesar da área extra-radicular ser localizada dentro da lesão periapical, é distinta da própria lesão (figura 8). As bactérias na zona extra-radicular ocupam 2mm apicais da superfície externa da raiz em 83% dos casos (Mohammadi et al., 2012).



**Figura 8 - Molar maxilar com lesão periapical extra-radicular** (Ricucci & Siqueira, 2010a)

É sabido que os micróbios que originam as infecções extra-radulares podem estar relacionados ou não com as bactérias que se encontram dentro da raiz devido ao seu metabolismo e conseqüentemente à sua sobrevivência. Se a infecção extra-radicular for dependente da infecção intra-radicular, uma vez feito o tratamento endodôntico e presumindo que as bactérias foram erradicadas, a infecção extra-radicular fica resolvida. Quando ocorre o contrário, isto é, quando a infecção extra-radicular é independente da intra-radicular, os micróbios persistem mesmo que o tratamento endodôntico tenha sido bem-sucedido. Mesmo assim, o componente extra ou intra-radicular responsável por manter e propagar a infecção crônica extra-radicular continua desconhecido (Del Fabbro et al., 2014) (Ricucci et al., 2015).

Através de métodos moleculares, num estudo que tinha como objetivo analisar a microbiota das infecções extra-radulares foram detetados 44 grupos taxonômicos que pertenciam a 6 filos e a 38 gêneros. O filo com mais representantes foi *Firmicutes*, seguido pelo *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*. As espécies mais frequentemente relatadas foram *Actinomyces* (*A. israelii*, *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, *A. viscosus*), *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium propionicum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella oralis*, *Parvimonas micra*, e *Fusobacterium nucleatum* (J F Siqueira & Rôças, 2009a).

A actinomicose apical resulta da infecção apical por *Actinomyces spp* ou *Propionibacterium propionicum*. Esta forma de infecção extra-radicular é independente da infecção intra-radicular (José F. Siqueira & Rôças, 2009b). A capacidade de aderência, co-agregação e sobrevivência dos *Actinomyces spp* e *Propionibacterium spp* na zona extra-radicular pode contribuir com a relação da infecção extra-radicular. A maior parte dos membros *Actinomyces spp* e *Propionibacterium spp* apresentam fímbrias na sua estrutura que têm uma função importante na capacidade de infecção. A função das fímbrias no estabelecimento do biofilme extra-radicular inclui: adesão aos detritos dentinários forçados para o exterior através do forâmen apical à medida que estes atingem os tecidos periapicais; fixação a outras bactérias ou células hospedeiras; aderência à superfície do ápex radicular ou a co-agregação com outras bactérias. Além disso, a virulência das estirpes e a resistência do hospedeiro à infecção aparentam ser fatores importantes para que a infecção extra-radicular se desenvolva ou não (Wang, Jiang, Chen, Zhu, & Liang, 2012).

A prevalência das espécies de *Treponema* nas infecções extra-radulares varia de acordo com o tipo de infecção (Rosa, Signoretti, Montagner, Gomes, & Jacinto, 2015).

Neste estudo foram comparadas amostras extra-radiculares retiradas de abscessos apicais agudos e de lesões crônicas. As lesões crônicas apresentaram uma prevalência inferior de *Treponema spp* (28% dos casos) quando comparada à do exsudado purulento dos abscessos apicais agudos (90-95% dos casos) (Rosa et al., 2015). Estes dados são consistentes com estudos anteriores visto que as espécies mais frequentemente encontradas em abscessos apicais agudos foram *Treponema socranskii* e *Treponema denticola* (J F Siqueira & Rôças, 2009b). Estes microrganismos têm várias determinantes de virulência que permitem a interação positiva com outras bactérias patogênicas e, ao mesmo tempo, uma interação negativa com o sistema imunológico do hospedeiro promovendo a progressão da infecção. Como é sabido, *Treponema denticola* em associação com a *Porphyromonas gingivalis* e com a *Tannerella forsythia* formam um complexo vermelho, isto é, um grupo de bactérias fortemente relacionado com parâmetros clínicos do diagnóstico de periodontites. Outras associações bastante comuns são as da *T. socranskii* com *T. denticola*, *T. maltophilum* e *T. lecithinolyticum* (Rosa et al., 2015).

Análises metaproteômicas, isto é, análises através do estudo de todas as amostras de proteína retiradas diretamente de fontes específicas, neste caso o pus proveniente dos abscessos, revelaram um elevado número de proteínas nas amostras comparativamente com amostras de infecções assintomáticas. Isto é expectável visto que as células bacterianas responsáveis pela evolução das infecções agudas estão num processo ativo de expressão proteica. Por outro lado nas amostras de pus retiradas dos abscessos está a ocorrer uma resposta agressiva do hospedeiro que pode levar à morte das células do hospedeiro e das bactérias o que faz com que mais proteínas sejam geradas (Provenzano et al., 2013).



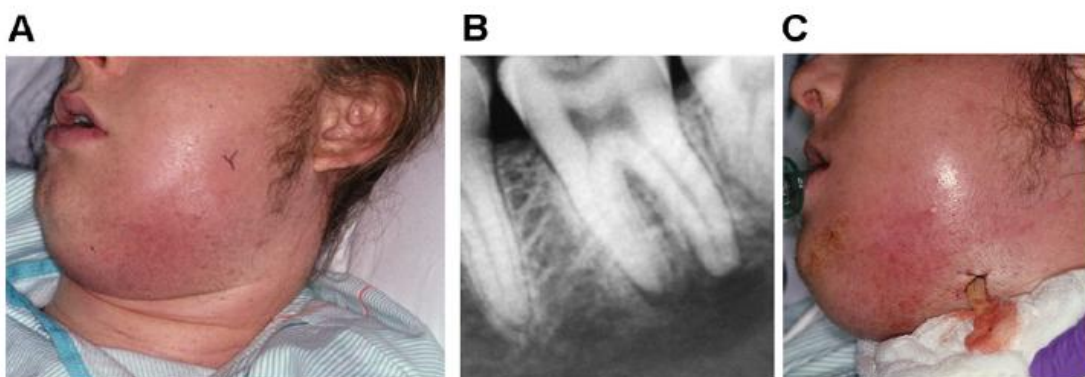
## 7. Tratamento

O tratamento das patologias do sistema radicular baseia-se no procedimento mecânico e químico dos canais radiculares. O prognóstico da terapia endodôntica fica essencialmente dependente da existência de bactérias no interior das raízes cultiváveis na altura do encerramento dos canais radiculares (obturação) (Figdor & Gulabivala, 2011).

Devido às características anatómicas deste sistema complexo, o controlo da infeção endodôntica é um processo distinto do controlo das infeções que ocorrem noutras regiões anatómicas, em que resposta imunitária do hospedeiro pode eliminar a infeção. As defesas imunitárias do hospedeiro não conseguem resolver sozinhas as infeções endodônticas, pelo que é necessário que um tratamento seja instituído. Só a cooperação entre todos estes elementos pode conduzir à eliminação dos microrganismos e à cura da periodontite apical (José F. Siqueira & Rôças, 2009a).

Os componentes imprescindíveis para o controlo e eliminação da infeção endodôntica compreendem: resposta imunológica do hospedeiro, a preparação quimiomecânica, os irrigantes antimicrobianos, medicação intracanal com antissépticos locais, obturação tridimensional do canal e por último a restauração coronária (Savani, Sabbah, Sedgley, & Whitten, 2014).

No caso do abcesso apical agudo é necessário fazer a drenagem e posterior tratamento intra-canalar ou, em último recurso, a extração do dente respetivo para remover o foco da infeção (José F. Siqueira & Rôças, 2013a) (Figura 9).



**Figura 9 - Características clínicas e imagiológicas de um abcesso apical agudo difuso e aspetos do seu tratamento. Radiografia em que se observa uma lesão associada ao 2º molar inferior que está a causar a infeção extra oral (B); drenagem extra-oral do abcesso (C) (José F. Siqueira & Rôças, 2013a)**

## Antibioterapia

As infecções intra-radulares não são tratáveis com antibióticos sistêmicos mesmo que a maior parte das bactérias seja por si só suscetível aos antibióticos correntemente utilizados. A ineficácia dos antibióticos deve-se essencialmente a dois problemas: 1) baixa distribuição num espaço que é avascular; 2) as infecções endodônticas serem causadas por biofilmes que são naturalmente resistentes aos antibióticos (Ricucci & Siqueira, 2010a).

Embora não seja usual, em alguns casos complicados de abscesso apical agudo pode ser prescrita antibioterapia: abscessos associados a causas sistêmicas que incluem febre, mal-estar e linfadenopatias; infecções disseminadas que resultem em celulites, edema difuso progressivo e trismos; e pacientes terapeuticamente comprometidos com risco aumentado de infecções secundárias focais (José F. Siqueira & Rôças, 2013a) (Cope, Francis, Wood, Mann, & Chestnutt, 2014).

## 8. Microrganismos presentes após retratamento endodôntico

O sucesso do tratamento endodôntico é geralmente elevado (85% a 90%) quando este é feito sob condições assépticas que seguem os princípios clínicos. O insucesso terapêutico é normalmente devido a procedimentos clínicos insatisfatórios que não contemplaram a correta desinfecção dos canais antes de fechar os canais. Mesmo quando o tratamento endodôntico é concluído com sucesso, existem casos em que a infecção apical permanece visível por radio-transparência mesmo após vários follow-up (Nair, 2006) (Ng, Mann, Rahbaran, Lewsey, & Gulabivala, 2007).

Os fatores que podem eventualmente contribuir para a perpetuação da rádio-transparência são a persistência de microrganismos patogênicos dentro do canal, infecção extra-radicular derivada de uma actinomicose, material de obturação extruído apicalmente ou corpos estranhos que causem reações inflamatórias e quistos (Su et al., 2010). Em alguns casos a rádio-transparência pode ser interpretada como insucesso do tratamento mas devido à formação de tecido cicatricial (Su et al., 2010).

Os dentes tratados previamente com lesões periapicais persistentes podem ser conservados com retratamentos não cirúrgicos quando o dente é restaurável e periodontalmente são. Tanto *Actinomyces israelii* como *Propionibacterium propionicum* são encontradas repetidamente nos tecidos periapicais por não responderem ao tratamento convencional (Nair, 2006). A existência de istmos, canais laterais e ramificações apicais nos canais radiculares pode ser outra possível causa para a falha dos tratamentos endodônticos visto que podem estar obstruídos com bactérias. Estes locais difíceis de aceder podem não estar ao alcance dos instrumentos endodônticos e dos irrigantes antimicrobianos. Mesmo que os agentes antibacterianos alcancem estas áreas não existe garantia que estes consigam erradicar os microrganismos visto que estes estão dispostos em biofilmes e portanto têm maior resistência aos antimicrobianos (Ricucci & Siqueira, 2010b).

Devido à configuração física dos canais radiculares, obter uma amostra representativa destas localizações nem sempre é fácil. Esta dificuldade acresce em pacientes que necessitam de retratamento em que o número de microrganismos acessíveis pode estar reduzido e o número de células microbianas podem ser perdidas durante os procedimentos que envolvem a remoção do material de obturação do interior dos canais. Como consequência, a prevalência das espécies causadoras pode ser subestimada (José F. Siqueira & Rôças, 2004).

Consoante os métodos de recolha de amostras e a sua posterior análise são apuradas prevalências diferentes de *Enterococcus faecalis* nos canais radiculares. Em dentes em que o tratamento endodôntico fracassou, os estudos apontam para uma prevalência de cerca de 19% a 70% através de cultura e 67% a 90% através de PCR (Lins et al., 2013). Em caso de infeção endodôntica primária esta espécie é menos abundante variando entre 4 a 13% em cultura e 33 a 60% utilizando PCR.

As bactérias encontradas nos casos em que o tratamento falha são predominantemente cocos gram-positivos, bastonetes e filamentos (Su et al., 2010). Por cultura, as espécies pertencentes aos géneros *Actinomyces*, *Enterococcus* e *Propionibacterium* foram várias vezes isoladas e caracterizadas a partir dos canais radiculares. Espécies de fungos como a *Candida albicans* foram também descritas.

Num estudo, que recorreu às técnicas de microscopia (CSEM), amostras retiradas da superfície do ápex da lesão periapical de um dente para retratamento continham *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces meyeri*, *Propionibacterium propionicum*, *Clostridium botulinum*, *Parvimonas micra* e *Bacteroides ureolyticus* (Signoretti et al., 2011). Através deste estudo concluiu-se que as bactérias anaeróbias gram-positivas e os biofilmes extra-radiculares estão na origem das patologias periapicais persistentes e que o retratamento endodôntico conjugado com a microcirurgia periapical são alternativas possíveis para a resolução das infeções extra-radiculares persistentes.

### III. Conclusão

O objetivo principal do tratamento endodôntico é a manutenção e restauração da saúde dos tecidos periapicais. Devido à periodontite apical ser uma doença causada primariamente por bactérias que se infiltram no sistema radicular, o sucesso do tratamento endodôntico vai depender da limpeza dos canais eliminando a infecção intracanal e do controlo da infecção nos casos de retratamento a fim de reduzir ao máximo as populações bacterianas dentro das raízes. É evidente que em situações como reabsorções ou complicações intraoperatórias existe uma variedade de outros objetivos secundários mas, mesmo nestes casos, o sucesso final depende do controlo eficaz da componente microbiana. Como se sabe, os microrganismos podem ganhar resistência aos agentes desinfetantes e aos medicamentos endodônticos, aumentando o desafio de os eliminar completamente durante o tratamento intra-canal.

Os resultados obtidos em estudos de índole molecular e de cultura mostraram que nas infeções endodônticas se podem encontrar mais de 400 espécies microbianas pertencentes a 100 géneros e 9 filos distintos. Os filos predominantes são *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria* e a diversidade bacteriana varia consoante o tipo de infeção. É de extrema importância descobrir ou identificar o grupo taxonómico de bactérias que vai suportar todas as etapas do tratamento anti-microbiano de modo a compreender o seu papel no resultado final do tratamento e encontrar medidas mais eficazes e previsíveis para lidar com elas.

Os métodos de identificação baseados em cultura não conseguem, muitas vezes, reproduzir as condições de crescimento e desenvolvimento necessárias para as bactérias fastidiosas que necessitam de um ambiente restrito e de requisitos nutricionais muito exigentes. A microscopia direta e os ensaios baseados em imunologia foram os métodos de cultura independente utilizados tradicionalmente. A sensibilidade e a especificidade destes métodos pode variar muito dependendo dos organismos em causa. A observação microscópica direta exige uma presença significativa de microrganismos e os testes serológicos acabam por sofrer contaminações cruzadas e podem ser inconclusivos se os pacientes estiverem imunocomprometidos. A introdução de métodos moleculares aumentou significativamente a capacidade de diagnosticar infeções com cultura negativa. Dentro dos vários tipos de métodos disponíveis a sequenciação dos genes que codificam para o ARNr 16S é talvez a técnica mais utilizada para identificar bactérias

incultiváveis uma vez que é relativamente fácil desenhar primers universais, que permitem a amplificação de bactérias de todos os filos.

A disparidade existente entre resultados obtidos com os métodos de cultura e resultados obtidos com métodos moleculares bem como a dificuldade existente em identificar de forma inequívoca a causa bacteriana das diferentes infecções endodônticas, indicam que é necessário continuar a investigação nesta área.

#### IV. Bibliografia

- Al-Omari, M., & Al-Samahi, S. (2014). Detection of bacteria in endodontic samples and its association with defined clinical signs and symptoms of endodontic infection. *Saudi Journal of Oral Sciences*, *1*(2), 83–89. <http://doi.org/10.4103/1658-6816.138470>
- Alsunaien, T., Pratten, J., Ng, Y.-L., Gulabivala, K., & Ready, D. (2010). Effect of transport and storage conditions on recovery of root canal isolates. *International Endodontic Journal*, *43*(4), 353. [http://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2010.01682\\_8](http://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2010.01682_8)
- Anderson, A. C., Al-Ahmad, A., Elamin, F., Jonas, D., Mirghani, Y., Schilhabel, M., ... Rehman, A. (2013). Comparison of the bacterial composition and structure in symptomatic and asymptomatic endodontic infections associated with root-filled teeth using pyrosequencing. *PLoS ONE*, *8*(12), 1–13. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0084960>
- Anderson, A. C., Hellwig, E., Vespermann, R., Wittmer, A., Schmid, M., Karygianni, L., & Al-Ahmad, A. (2012). Comprehensive Analysis of Secondary Dental Root Canal Infections: A Combination of Culture and Culture-Independent Approaches Reveals New Insights. *PLoS ONE*, *7*(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0049576>
- Andreasen, F. M., & Kahler, B. (2015). Pulpal Response after Acute Dental Injury in the Permanent Dentition: Clinical Implications—A Review. *Journal of Endodontics*, *41*(3), 299–308. <http://doi.org/10.1016/j.joen.2014.11.015>
- Blome, B., Braun, A., Sobarzo, V., Molecular, J. S., & Jepsen, S. (2008). Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiology Immunology*, *23*(5), 384–390. <http://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2008.00440>
- Bottari, B., Ercolini, D., Gatti, M., & Neviani, E. (2006). Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. *Applied*

*Microbiology and Biotechnology*, 73(3), 485–494. <http://doi.org/10.1007/s00253-006-0615-z>

Cope, A., Francis, N., Wood, F., Mann, M. K., & Chestnutt, I. G. (2014). Systemic antibiotics for symptomatic apical periodontitis and acute apical abscess in adults. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 26(6), CD010136. <http://doi.org/10.1002/14651858.CD010136.pub2>

Del Fabbro, M., Samaranayake, L. P., Lolato, A., Weinstein, T., & Taschieri, S. (2014). Analysis of the secondary endodontic lesions focusing on the extraradicular microorganisms: an overview. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 5(4), 245–254. <http://doi.org/10.1111/jicd.12045>

Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C. R., Yu, W. H., ... Wade, W. G. (2010). The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology*, 192(19), 5002–5017. <http://doi.org/10.1128/JB.00542-10>

Dezan, E. J., Holland, R., Consolaro, A., Ciesielski, F. I. N., & Jardim, E. G. J. (2012). Experimentally Induced Anachoresis in the Periapical Region After Root Canal Filling. *International Journal Odontostomatology*, 6(1), 5–10. <http://doi.org/10.4067/S0718-381X2012000100001>

Dige, I., Grønkjær, L., & Nyvad, B. (2014). Molecular studies of the structural ecology of natural occlusal caries. *Caries Research*, 48(5), 451–60. <http://doi.org/10.1159/000357920>

Figdor, D., & Gulabivala, K. (2011). Survival against the odds: microbiology of root canals associated with post-treatment disease. *Endodontic Topics*, 18(1), 62–77. <http://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2011.00259.x>

Flynn, T. R., Paster, B. J., Stokes, L. N., Susarla, S. M., & Shanti, R. M. (2012). Molecular Methods for Diagnosis of Odontogenic Infections. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 70(8), 1854–1859. <http://doi.org/10.1016/j.joms.2011.09.009>

- Fransson, H. (2012). *On the repair of the dentine barrier*. *Swed Dent J Suppl*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22834214>
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Methods*, *133*(6), 1–4. <http://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Gomes, C., Fidel, S., Fidel, R., & de Moura Sarquis, M. I. (2010). Isolation and Taxonomy of Filamentous Fungi in Endodontic Infections. *Journal of Endodontics*, *36*(4), 626–629. <http://doi.org/10.1016/j.joen.2010.01.016>
- Graunaite, I., Lodiene, G., & Maciulskiene, V. (2011). Pathogenesis of Apical Periodontitis: a Literature Review. *Journal of Oral and Maxillofacial Research*, *2*(4), 1–15. <http://doi.org/10.5037/jomr.2011.2401>
- Haapasalo, M., Udnæs, T., & Endal, U. (2003). Persistent , recurrent , and acquired infection of the root canal system post-treatment. *Endodontic Topics*, 29–56. <http://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2003.00041.x>
- Hsiao, W. W., Li, K. L., Liu, Z., Jones, C., Fraser-Liggett, C. M., & Fouad, A. F. (2012). Microbial transformation from normal oral microbiota to acute endodontic infections. *BMC Genomics*, *13*(1), 345. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-13-345>
- Jakovljevic, A., & Andric, M. (2014). Human cytomegalovirus and epstein-barr virus in etiopathogenesis of apical periodontitis: A systematic review. *Journal of Endodontics*, *40*(1), 6–15. <http://doi.org/10.1016/j.joen.2013.10.001>
- Jiang, Y. T., Xia, W. W., Li, C. L., Jiang, W., & Liang, J. P. (2009). Preliminary study of the presence and association of bacteria and archaea in teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal*, *42*(12), 1096–1103. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2009.01639.x>
- Latoo, S., Shah, A. A., Ahmad, I., Qadir, S., Bhagat, R. K., & Lone, K. A. (2011). Endodontic Microbiology: Review of literature. *International Journal of Clinical Cases and Investigations*, *2*(6), 24–36.
- Li, H., Chen, V., Chen, Y., Baumgartner, J. C., & Machida, C. a. (2009). Herpesviruses in Endodontic Pathoses: Association of Epstein-Barr Virus with Irreversible

- Pulpitis and Apical Periodontitis. *Journal of Endodontics*, 35(1), 23–29.  
<http://doi.org/10.1016/j.joen.2008.09.017>
- Li, L., Hsiao, W. W. L., Nandakumar, R., Barbuto, S. M., Mongodin, E. F., Paster, B. J., & Fraser-Liggett, C. M. (2010). Analyzing endodontic infections by deep coverage pyrosequencing. *Journal of Dental Research*, 89(9), 980–984.  
<http://doi.org/10.1177/0022034510370026>
- Lins, R. X., De Oliveira Andrade, A., Hirata Junior, R., Wilson, M. J., Lewis, M. a O., Williams, D. W., & Fidel, R. A. S. (2013). Antimicrobial resistance and virulence traits of *Enterococcus faecalis* from primary endodontic infections. *Journal of Dentistry*, 41(9), 779–786. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.07.004>
- Martinho, F. C., Leite, F. R. M., Nascimento, G. G., Cirelli, J. a., & Gomes, B. P. F. a. (2014). Clinical investigation of bacterial species and endotoxin in endodontic infection and evaluation of root canal content activity against macrophages by cytokine production. *Clinical Oral Investigations*, 18, 2095–2102.  
<http://doi.org/10.1007/s00784-014-1198-1>
- Mistry, K., Sanghvi, Z., & Parmar, G. (2011). Endodontic Pathogens - Revisited. *International Journal of Contemporary Dentistry*, 2(3), 14–19.
- Mohammadi, Z., Palazzi, F., Giardino, L., & Shalavi, S. (2012). Microbial biofilms in endodontic infections: an update review. *Biomedical Journal*, 36(2), 59–70.  
<http://doi.org/10.4103/2319-4170.110400>
- Montagner, F., Gomes, B. P. F. a, & Kumar, P. S. (2010). Molecular fingerprinting reveals the presence of unique communities associated with paired samples of root canals and acute apical abscesses. *Journal of Endodontics*, 36(9), 1475–1479.  
<http://doi.org/10.1016/j.joen.2010.06.004>
- Nair, P. N. R. (2006). On the causes of persistent apical periodontitis: A review. *International Endodontic Journal*, 39(4), 249–281. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2006.01099.x>

- Nair, P. N. R. (2009). Abusing technology? Culture-difficult microbes and microbial remnants. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, *104*(4), 569–570. <http://doi.org/10.1016/j.tripleo.2007.06.003>
- Ng, Y.-L., Mann, V., Rahbaran, S., Lewsey, J., & Gulabivala, K. (2007). Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature – Part 1. Effects of study characteristics on probability of success. *International Endodontic Journal*, *40*(12), 921–939. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2007.01322.x>
- Ozbek, S. M., Ozbek, A., & Erdorgan, A. S. (2009). Analysis of *Enterococcus faecalis* in samples from Turkish patients with primary endodontic infections and failed endodontic treatment by real-time PCR SYBR green method. *Journal of Applied Oral Science: Revista FOB*, *17*(5), 370–374. <http://doi.org/10.1590/S1678-77572009000500004>
- Özok, a. R., Persoon, I. F., Huse, S. M., Keijser, B. J. F., 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. *International Endodontic Journal*, *45*(6), 530–541. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.02006.x>
- Peciuliene, V., Maneliene, R., Balcikonyte, E., Drukteinis, S., & Rutkunas, V. (2008). Microorganisms in root canal infections: a review. *Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal*, *10*(1), 4–9.
- Procop, G. W. (2007). Molecular Diagnostics for the Detection and Characterization of Microbial Pathogens. *Clinical Infectious Diseases*, *45*(Supplement 2), S99–S111. <http://doi.org/10.1086/519259>
- Provenzano, J. C., Siqueira, J. F., Rôças, I. N., Domingues, R. R., Paes Leme, A. F., & Silva, M. R. S. (2013). Metaproteome Analysis of Endodontic Infections in Association with Different Clinical Conditions. *PLoS ONE*, *8*(10). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0076108>

- Rahman, M. T., Uddin, M. S., Sultana, R., Moue, A., & Setu, M. (2013). Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 4(1), 30–36. <http://doi.org/10.3329/akmmcj.v4i1.13682>
- Ribeiro, A. C., Matarazzo, F., Favari, M., Zezell, D. M., & Mayer, M. P. a. (2011). Exploring bacterial diversity of endodontic microbiota by cloning and sequencing 16S rRNA. *Journal of Endodontics*, 37(7), 922–926. <http://doi.org/10.1016/j.joen.2011.04.007>
- Ricucci, D., & Siqueira, J. F. (2010a). Biofilms and apical periodontitis: Study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *Journal of Endodontics*, 36(8), 1277–1288. <http://doi.org/10.1016/j.joen.2010.04.007>
- Ricucci, D., & Siqueira, J. F. (2010b). Fate of the Tissue in Lateral Canals and Apical Ramifications in Response to Pathologic Conditions and Treatment Procedures. *Journal of Endodontics*, 36(1), 1–15. <http://doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.038>
- Ricucci, D., Siqueira, J. F., Lopes, W. S. P., Vieira, A. R., & Rôças, I. N. (2015). Extraradicular Infection as the Cause of Persistent Symptoms: A Case Series. *Journal of Endodontics*, 41(2), 265–273. <http://doi.org/10.1016/j.joen.2014.08.020>
- Rôças, I. N., Alves, F. R. F., Santos, A. L., Rosado, A. S., & Siqueira, J. F. (2010). Apical root canal microbiota as determined by reverse-capture checkerboard analysis of cryogenically ground root samples from teeth with apical periodontitis. *Journal of Endodontics*, 36(10), 1617–1621. <http://doi.org/10.1016/j.joen.2010.07.001>
- Rôças, I. N., & Siqueira, J. F. (2008). Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(11), 3599–3606. <http://doi.org/10.1128/JCM.00431-08>
- Rôças, I. N., & Siqueira, J. F. (2010). Identification of Bacteria Enduring Endodontic Treatment Procedures by a Combined Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction and Reverse-Capture Checkerboard Approach. *Journal of Endodontics*, 36(1), 45–52. <http://doi.org/10.1016/j.joen.2009.10.022>

- Rosa, T. P., Signoretti, F. G. C., Montagner, F., Gomes, B. P. F. D. A., & Jacinto, R. C. (2015). Prevalence of *Treponema* spp. in endodontic retreatment-resistant periapical lesions. *Brazilian Oral Research*, 29(1), 01–01. <http://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2015.vol29.0031>
- Santos, A. L., Siqueira, J. F., 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), 14–21. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0028088>
- Sathorn, C., Parashos, P., & Messer, H. H. (2007). How Useful Is Root Canal Culturing in Predicting Treatment Outcome? *Journal of Endodontics*, 33(3), 220–225. <http://doi.org/10.1016/j.joen.2006.11.006>
- Savani, G. M., Sabbah, W., Sedgley, C. M., & Whitten, B. (2014). Current Trends in Endodontic Treatment by General Dental Practitioners: Report of a United States National Survey. *Journal of Endodontics*, 40(5), 618–624. <http://doi.org/10.1016/j.joen.2014.01.029>
- Schaudinn, C., Carr, G., Gorur, a., Jaramillo, D., Costerton, J. W., & Webster, P. (2009). Imaging of endodontic biofilms by combined microscopy (FISH/cLSM - SEM). *Journal of Microscopy*, 235(2), 124–127. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2009.03201.x>
- Sibley, C. D., Peirano, G., & Church, D. L. (2012). Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 12(3), 505–21. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.01.011>
- Signoretti, F. G. C., Endo, M. S., Gomes, B. P. F. a, Montagner, F., Tosello, F. B., & Jacinto, R. C. (2011). Persistent extraradicular infection in root-filled asymptomatic human tooth: Scanning electron microscopic analysis and microbial investigation after apical microsurgery. *Journal of Endodontics*, 37(12), 1696–1700. <http://doi.org/10.1016/j.joen.2011.09.018>

- Siqueira, J. F., Alves, F. R. F., & Rôças, I. N. (2011). Pyrosequencing analysis of the apical root canal microbiota. *Journal of Endodontics*, 37(11), 1499–1503. <http://doi.org/10.1016/j.joen.2011.08.012>
- Siqueira, J. F., Fouad, A. F., & Rôças, I. N. (2012). Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *Journal of Oral Microbiology*, 4(2012), 1–15. <http://doi.org/10.3402/jom.v4i0.10743>
- Siqueira, J. F., & Rôças, I. N. (2004). Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 97(1), 85–94. [http://doi.org/10.1016/S1079-2104\(03\)00353-6](http://doi.org/10.1016/S1079-2104(03)00353-6)
- Siqueira, J. F., & Rôças, I. N. (2005). Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2--Redefining the endodontic microbiota. *Journal of Endodontia*, 31(7), 488–498. <http://doi.org/00004770-200507000-00003> [pii]
- Siqueira, J. F., & Rôças, I. N. (2007). Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Brazilian Dental Journal*, 18(4), 267–280. <http://doi.org/10.1590/S0103-64402007000400001>
- Siqueira, J. F., & Rôças, I. N. (2009a). Community as the unit of pathogenicity: An emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 107(6), 870–878. <http://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.01.044>
- Siqueira, J. F., & Rôças, I. N. (2009b). Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis. *Journal of Oral Microbiology*, 1(2009), 1–12. <http://doi.org/10.3402/jom.v1i0.2009>
- Siqueira, J. F., & Rôças, I. N. (2009a). Diversity of endodontic microbiota revisited. *Journal of Dental Research*, 88(11), 969–981. <http://doi.org/10.1177/0022034509346549>

- Siqueira, J. F., & Rôças, I. N. (2009b). The microbiota of acute apical abscesses. *Journal of Dental Research*, 88(1), 61–65. <http://doi.org/10.1177/0022034508328124>
- Siqueira, J. F., & Rôças, I. N. (2013a). Microbiology and treatment of acute apical abscesses. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), 255–273. <http://doi.org/10.1128/CMR.00082-12>
- Siqueira, J. F., & Rôças, I. N. (2013b). PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *Journal of Dentistry*, 31(5), 333–339. [http://doi.org/10.1016/S0300-5712\(03\)00051-4](http://doi.org/10.1016/S0300-5712(03)00051-4)
- Siqueira, J. F., Rôças, I. N., & Rosado, A. S. (2005). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to the analysis of endodontic infections. *Journal of Endodontia*, 31(11), 775–782. <http://doi.org/10.1097/01.don.0000155221.33667.bb>
- Siqueira, J. F., Rôças, I. N., Souto, R., de Uzeda, M., & Colombo, a P. (2010). Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 89(6), 744–748. <http://doi.org/10.1067/moe.2000.106576>
- Su, L., Gao, Y., Yu, C., Wang, H., & Yu, Q. (2010). Surgical endodontic treatment of refractory periapical periodontitis with extraradicular biofilm. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 110(1), e40–e44. <http://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.12.051>
- Tennert, C., Fuhrmann, M., Wittmer, A., Karygianni, L., Altenburger, M. J., Pelz, K., ... Al-Ahmad, A. (2013). New Bacterial Composition in Primary and Persistent/Secondary Endodontic Infections with Respect to Clinical and Radiographic Findings. *Journal of Endodontics*, 40(5), 670–7. <http://doi.org/10.1016/j.joen.2013.10.005>
- Tronstad, L., & Sunde, P. T. (2013). The evolving new understanding of endodontic infections. *Endodontic Topics*, 6(1), 57–77. <http://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2003.00039.x>

- Tzanetakís, 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. *Journal of Endodontics*, *41*(8), 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.joen.2015.03.010>
- Wade, W. G. (2013). The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research*, *69*(1), 137–143. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.006>
- Wang, J., Jiang, Y., Chen, W., Zhu, C., & Liang, J. (2012). Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. *Journal of Endodontics*, *38*(7), 954–959. <http://doi.org/10.1016/j.joen.2012.03.004>
- Weile, J., & Knabbe, C. (2009). Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *394*(3), 731–742. <http://doi.org/10.1007/s00216-009-2779-8>
- Wilson, S. M., & Bacic, A. (2012). Preparation of plant cells for transmission electron microscopy to optimize immunogold labeling of carbohydrate and protein epitopes. *Nat. Protocols*, *7*(9), 1716–1727. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2012.096>
- Zoletti, G. O., Carmo, F. L., Pereira, E. M., Rosado, A. S., Siqueira, J. F., & Santos, K. R. N. (2010). Comparison of endodontic bacterial community structures in root-canal-treated teeth with or without apical periodontitis. *Journal of Medical Microbiology*, *59*(11), 1360–1364. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.018887-0>