

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

MARTA ROCHA CAMPOS

MICROBIOTA ENDODÔNTICA ASSOCIADA AO INSUCESSO DO TRATAMENTO
DE CANAIS RADICULARES: REVISÃO DE LITERATURA

Porto Alegre
2014

MARTA ROCHA CAMPOS

MICROBIOTA ENDODÔNTICA ASSOCIADA AO INSUCESSO DO TRATAMENTO
DE CANAIS RADICULARES: REVISÃO DE LITERATURA

Trabalho apresentado à Faculdade de
Odontologia, da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, como requisito
obrigatório para a obtenção de grau de
Especialista em Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Montagner

Porto Alegre

2014

Dedico este trabalho a minha mãe Sibila, a pessoa que não mede esforços para me incentivar, me apoiar e aquela que sempre esteve ao meu lado frente às dificuldades e alegrias. Por ter se dedicado tanto a mim e por ter me dado forças e amor incondicional para que eu conseguisse alcançar os meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela minha família, saúde e por iluminar o meu caminho;

A minha mãe, minha melhor amiga, obrigada por tanto amor e carinho incondicional.

Aos meus dois amores, protetores, e além de irmãos, melhores amigos: Felipe e Pedro. Agradeço por serem tão carinhosos comigo, pela nossa amizade e por sermos tão unidos. Vocês são a minha base. Tenho muito orgulho de vocês dois.

A minha sobrinha e afilhada Isabella, que me proporciona constantes momentos de felicidade, fazendo com que eu até esqueça as ansiedades e aflições. És a minha preciosidade.

Ao Guilherme, meu namorado, minha melhor companhia, meu porto seguro. Obrigada por ter me acompanhado (e muito!) nessa caminhada, pela paciência e compreensão nos momentos mais difíceis, pelas palavras de carinho e conforto. Você sempre me incentiva, fazendo com que tudo pareça mais fácil. Obrigada por todo o amor e força que você me passa diariamente. Ao seu lado sou muito feliz!

As minhas amigas, que me acompanham desde sempre, e torcem pelo meu sucesso, apesar de longe fisicamente, estão presentes comigo em todos os momentos. Um agradecimento especial as minhas queridas amigas que estiveram comigo nesses dois anos, Marcele e Vitória. Obrigada pela amizade cultivada e por terem tornado esse período que estive em Porto Alegre muito mais leve, divertido e feliz.

Ao meu orientador, Professor Doutor Francisco Montagner, o qual admiro muito. Obrigada pela convivência, orientações e ensinamentos transmitidos a mim com tanta atenção. Agradeço muito pela sua dedicação e total disponibilidade com o nosso trabalho.

Aos professores e as colegas do curso, por todo convívio e ensinamentos compartilhados. O meu aprendizado nesses dois anos foi imensurável. Muito obrigada!

As minhas colegas de trabalho, e amigas, Emília, Clarice, Letícia, Eneida, Luciana e Bianca, obrigada por tornarem os meus dias mais divertidos, por me dedicarem tanto carinho, pelo convívio agradável, pelo trabalho em equipe, risadas, conquistas, enfim, obrigada a todas vocês por serem, também, responsáveis por eu amar tanto o nosso CVM.

Ao meu trabalho, pela oportunidade e por permitir que eu realizasse e concluísse mais uma etapa importante em minha vida. Sou muito feliz por fazer parte desta grande equipe.

“Há os que se queixam do vento. Os que esperam que ele mude. E os que procuram ajustar as velas.”

William G. Ward

RESUMO

CAMPOS, Marta R. **Microbiota endodôntica associada ao insucesso do tratamento de canais radiculares - Revisão de literatura.**

2014. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

O objetivo deste estudo foi descrever, através de uma revisão de literatura, a composição microbiana em dentes que apresentam infecções associadas ao insucesso do tratamento endodôntico relatada em artigos do tipo “Ensaio clínico” que utilizaram técnicas de cultura e moleculares de identificação microbiana. A base de dados utilizada para tal revisão foi MEDLINE (PUBMED), compreendendo artigos publicados entre 01 de janeiro de 1993 e 31 de dezembro de 2013. O termo de busca empregado foi [*Infection Root Canal*]. Sistematizou-se o estudo através de 3 tabelas, as quais abordaram a seleção da amostra, delineamento, aspectos metodológicos de estudo e o perfil microbiano de ambos os métodos. Foram selecionados 30 artigos, destes, 12 utilizaram o método de cultura, 21 métodos moleculares e três autores abordaram a associação de ambos métodos. A mediana de pacientes estudados foi de 24. O método de cultura microbiana isolou 195 cepas microbianas, que pertenciam a 119 espécies com predomínio de bactérias anaeróbias estritas e gram-positivas. Considerando-se as espécies mais frequentemente isoladas, observa-se *Enterococcus faecalis*, seguido de *Gemella morbillorum* e *Popionibacterium acnes*. Os métodos moleculares encontraram 182 espécies diferentes. Observou-se um predomínio de detecção de anaeróbios estritos e Gram-negativos. As espécies *Enterococcus* spp., *Treponema maltophilum* e *Prevotella baroniae* foram detectadas com frequência. No entanto, este resultado pode ser sugestivo, uma vez que alguns autores selecionaram métodos específicos para a identificação de certos tipos de bactérias. Os dados do presente estudo sugerem uma comunidade bacteriana intra-radicular associada ao fracasso no tratamento endodôntico com predominância de anaeróbios estritos e gram-positivos.

Palavras-chave: Endodontia; Microbiologia; Infecção.

ABSTRACT

CAMPOS, Marta R. **Microbiota endodontic associated with failure treatment of root canal: literature review**. 2014. Final Paper Specialization - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

The aim of this study was to describe, through a literature review, the microbial composition on teeth that have infections associated with failure of endodontic treatment reported in articles such as "clinical trial" that used classical and molecular techniques for microbial identification. The database used for this review was MEDLINE (PubMed) , comprising articles published between January 1, 1993 and December 31, 2013 . The search terms used were [Root Canal Infection] . After study selection, information such as study design, methodological aspects and microbial profiles were addressed. 30 articles, of which 12 used the culture method, 21 and three molecular methods were selected authors addressed the combination of both methods. The median of patients studied was 24. The method of microbial culture isolated 195 strains, belonging to 119 species, with predominance of anaerobic and Gram-positive bacteria. The most frequently isolated species were, *Enterococcus faecalis*, followed by *Gemella morbillorum* and *Propionibacterium acnes*. Molecular methods detected 182 different species. There was a predominance of Gram-negative and strict anaerobes. The species *Enterococcus* spp., *Treponema maltophilum* and *Prevotella baroniae* were frequently observed in the samples. However, this result may be suggestive, since some authors selected specific methods for identification of certain types of bacteria. Data from the present study suggest a intraradicular bacterial community associated with failed endodontic treatment with predominance of strict anaerobes and gram-positive.

Keywords: Endodontics; Microbiology; Infection

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos excluídos após leitura completa do artigo e motivos de exclusão.....	17
Tabela 2 - Aspectos, seleção da amostra, delineamento e aspectos metodológicos de estudo da infecção.....	18
Tabela 3 - Microrganismos descritos nos estudos e perfil microbiano das amostras avaliadas através do método de cultura microbiana.....	20
Tabela 4 - Estudos que avaliaram a microbiota de canais radiculares através dos métodos moleculares, microrganismos detectados e perfil microbiano dos achados.....	21

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVO.....	14
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4	RESULTADOS.....	16
5	DISCUSSÃO.....	22
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
	APÊNDICE A	
	APÊNDICE B	

INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre os principais aspectos do processo infeccioso endodôntico assume importância vital no estabelecimento de estratégias terapêuticas que visam o sucesso do tratamento, reconhecendo os microrganismos envolvidos, suas vias de acesso ao sistema de canais radiculares, o padrão de colonização microbiana desse sistema e as consequências da infecção endodôntica (LOPES; SIQUEIRA, 2010). A determinação do resultado do tratamento fundamenta-se através de critérios clínicos, tais como a ausência de sintomatologia clínica, mucosa apical normal, ausência de bolsa periodontal, ausência de fistula, restauração adequada, e também em critérios radiográficos, como a presença de lâmina dura, ligamento periodontal regular e redução ou ausência de imagem radiolúcida (ABBOTT, 1991; BENENATI; KHAJOTIA, 2002).

O êxito do tratamento não se observa quando surgem ou persistem sinais e/ou sintomas de uma infecção secundária ou persistente. A relação entre microrganismos e casos de insucesso da terapia endodôntica é confirmada pela literatura, a qual evidencia como principal causa da falha do tratamento endodôntico a sua persistência no interior ou no exterior do sistema de canais radiculares (PINHEIRO et al., 2003 a; SIQUEIRA JUNIOR, 2008).

Os microrganismos encontram no sistema de canais radiculares um ambiente favorável a sua sobrevivência e perpetuação. Diversos são os fatores que influenciam sua permanência, tais como o próprio nicho ecológico, a nutrição, presença ou não de oxigênio, pH e ainda, a concorrência ou cooperação com outros microrganismos (SUNDQVIST et al., 1998).

O rompimento das interações microbianas é de extrema importância para a eliminação de microrganismos do interior do sistema de canais radiculares. Para Nair (2004), a maioria das falhas ocorre quando não foi atingido um nível satisfatório para o controle e eliminação da infecção. Para sobreviverem no canal radicular já obturado, os microrganismos devem resistir às medidas de desinfecção intracanal (preparo químico-mecânico e medicação intracanal) e se adaptar há um meio onde há poucos nutrientes disponíveis. De acordo com Siqueira Junior (2001 a), um grupo restrito de microrganismos tem tais habilidades e podem estar

envolvidos nos fracassos endodônticos. Um estudo molecular realizado por Sakamoto et al. (2007) revelou que 42% das bactérias encontradas em amostras pós-instrumentação ou pós-medicação não são cultiváveis.

Lopes e Siqueira (2010) indicam que em sua maioria, os microrganismos encontram-se usualmente em suspensão na fase fluida do canal, podendo também se estabelecer aderidos às irregularidades das paredes do canal, em lacunas de reabsorção cementária, em ramificações, em deltas, na lesão perirradicular e, inclusive, intratubular, ratificando a afirmação de que os microrganismos permanecem nas porções profundas dos túbulos dentinários que servem como um reservatório para a nova infecção endodôntica (Love; Jenkinson, 2002).

As infecções endodônticas são classificadas conforme a localização da infecção e o momento em que se estabelece no canal radicular. A infecção intraradicular secundária é causada por microrganismos que não estavam presentes na infecção primária e que penetraram no canal durante o tratamento endodôntico, entre as sessões ou mesmo após a conclusão do tratamento. O autor define ainda, como infecção intraradicular persistente, quando a causa são microrganismos que, de alguma forma, resistiram aos procedimentos intracanaís de desinfecção. Os microrganismos foram membros da infecção primária ou de uma secundária. Portanto, tais infecções são geralmente difíceis de serem diferenciadas clinicamente (LOPES; SIQUEIRA, 2010).

A dificuldade de desestruturar por completo comunidades microbianas após os procedimentos de controle da infecção faz com que sejam constantemente realizadas pesquisas clínicas para a identificação das bactérias presentes em dentes com insucesso no tratamento endodôntico. Estes estudos adotam técnicas convencionais de cultivo microbiano e também técnicas modernas envolvendo o estudo de sequências de ácidos nucléicos (IWAHARA, 2006). A associação destes métodos tem permitido um estudo mais detalhado do perfil microbiano envolvido neste processo de manutenção de patologias apicais mesmo após o tratamento endodôntico. Avanços em métodos de amostragem microbiana e no crescimento e técnicas de identificação têm proporcionado muita informação nova sobre os componentes microbianos e complexos que estão associados a infecções endodônticas e periodontais (LOVE, 2002).

Estudos anteriores utilizando os métodos de cultura revelaram distintamente diferentes floras microbianas em relação a infecções primárias, incluindo as bactérias gram-positivas principalmente, anaeróbios facultativos e predominantemente alguns anaeróbios obrigatórios (SIQUEIRA JUNIOR et al., 2009). Gomes et al. (2004) demonstraram que a microbiota do canal radicular do dente tratado endodonticamente associado à lesão apical persistente difere substancialmente da microbiota de dentes com polpas necrosadas e não tratados, tanto qualitativamente, em termos de variabilidade de espécies, quanto quantitativamente. Devido ao número extenso de estudos, e considerando as diferentes metodologias empregadas, torna-se necessário sumarizar os resultados e realizar uma análise crítica dos mesmos.

2 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi descrever, através de uma revisão de literatura, a microbiota endodôntica associada ao insucesso do tratamento de canais radiculares relatada em estudos clínicos que utilizaram técnicas clássicas e moleculares de identificação microbiana.

3 MATERIAIS E MÉTODO

O percurso metodológico deste estudo consiste em uma revisão bibliográfica de artigos que tratam, especificamente, de ensaios clínicos relacionados à infecção radicular secundária/persistente. A base de dados utilizada para tal revisão foi MEDLINE (PUBMED) e o termo de busca abordado foi [*Infection root canal*].

Os critérios de inclusão foram: ensaios clínicos, publicados entre 01/01/1993 a 31/12/2013 relacionados ao insucesso do tratamento endodôntico, escritos em língua inglesa e que obtiveram amostras de canais radiculares de humanos. Foram excluídos desta revisão estudos de revisão de literatura: casos em que a pesquisa não foi realizada em humanos; onde se abordou apenas a infecção primária; ausência de tratamento endodôntico prévio, e casos em que o estudo abordou apenas uma bactéria específica. Os estudos rejeitados nesta ou em etapas posteriores foram registrados, junto com as razões da exclusão.

Elaborou-se uma tabela para que fosse realizada a extração de dados, facilitando a sua posterior tabulação e análise. Foram obtidas dos artigos, as seguintes informações:

- a) Localização Geográfica;
- b) Número de pacientes;
- c) Origem da amostra;
- d) Forma de coleta;
- e) Microrganismos presentes;
- f) Método de análise.

Os dados foram tabulados para posterior análise descritiva.

RESULTADOS

Conforme critérios de busca foram encontrados 731 artigos para análise. Após a avaliação preliminar dos títulos e resumos, 59 contemplavam os critérios de inclusão sendo que o texto completo de 30 artigos foi avaliado. Não foi possível obter o artigo de Sonntag & Sigurdsson (1996), sendo este também excluído da análise. Os artigos excluídos e os motivos para a sua exclusão estão descritos na **Tabela 1**. As **Tabelas 2** e **3** demonstram as informações extraídas dos estudos selecionados para análise.

Tabela 1 – Estudos excluídos após leitura completa do artigo e motivos de exclusão.

Referência (Ano)	Motivo da Exclusão
Kimura et al. (2011)	Estudo realizado em ratos
Love e Firth (2009)	Estudo histológico
Nair et al. (1999)	
Ricucci e Siqueira Jr (2010)	
Zehnder e Guggenheim (2009)	Revisão de literatura
JOE editorial board (2008)	
Chávez de Paz (2007)	
García (2007)	
Zehnder et al. (2005)	
Nair (2004)	
Goymerac e Woollard (2004)	
Siqueira e Rôças (2003)	
Siqueira et al. (2002 a)	
Siqueira Junior (2001a)	
Nair (1997)	
Cheung (1996)	
Sundqvist (1994)	
Roças e Siqueira (2013)	
Wang et al. (2010)	
Saito et al. (2006)	
Fouad et al. (2002)	
Siqueira Junior et al. (2002 b)	
Siqueira Junior (2001b)	
Jung et al. (2000)	
Sunde et al. (2000)	
Drucker et al. (1997)	
Siren et al. (1997)	
Kalfas et al. (2001)	Relatos de casos clínicos
Reader et al. (1994)	

Tabela 2 – Seleção da amostra, delineamento e aspectos metodológicos do estudo.

Estudo (Ano)	País	Pacientes (n)	Método de Análise da Amostra
Nobrega et al. (2013)	Brasil	40	Molecular
Signoretti et al. (2013)	Brasil	20	Cultura
Anderson et al. (2012)	Alemanha	21	Cultura e Molecular
Gomes et al. (2012)	Brasil	15	Molecular
Roças e Siqueira Junior (2012)	Brasil	42	Molecular
Wang et al. (2012)	China	23	Molecular
Chugal et al. (2011)	EUA	7	Molecular
Vidana et al. (2010)	Suécia	50	Cultura
Jiang et al. (2009)	China	35	Molecular
Roças et al. (2008)	Alemanha	17	Molecular
Cavrini et al. (2008)	Itália	23	Molecular
Gomes et al (2008)	Brasil	50	Cultura e Molecular
Sakamoto et al. (2008)	Brasil	9	Molecular
Gomes et al. (2006)	Brasil	50	Molecular
Gomes et al. (2005)	Piracicaba, SP	50	Cultura e Molecular
Foschi et al. (2005)	Itália	62	Molecular
Kaufman et al. (2005)	EUA	58	Molecular
Siqueira et al. (2005)	Brasil	21	Molecular
Gomes et al. (2004)	Piracicaba, SP	19	Cultura
Roças et al. (2004)	Brasil	14	Molecular
Siqueira e Rôças (2004)	Brasil	22	Molecular
Pinheiro et al. (2003 a)	Brasil	30	Cultura
Pinheiro et al. (2003 b)	Brasil	60	Cultura
Siqueira e Rôças (2003)	Brasil	12	Molecular
Hashimura et al. (2001)	Japão	12	Molecular
Rolph et al (2001)	Reino Unido	26	Molecular
Peciulienė et al. (2000)	Lituânia	25	Cultura
Sundqvist et al. (1998)	Suécia	54	Cultura
Molander et al. (1998)	Suécia	100	Cultura
Gomes et al. (1996)	Reino Unido	21	Cultura

Foram avaliados 30 artigos completos, oriundos de diversos países, dentre os quais estão Suécia, Reino Unido, China, Estados Unidos, Itália, Alemanha, Japão e em sua maioria no Brasil.

Deste total de estudos, 12 utilizaram o método de cultura e 21 métodos moleculares para identificação das bactérias presentes em infecções secundárias e persistentes. Três autores abordaram a associação de ambos métodos.

As amostras coletadas foram *in vivo*, a partir de cones de papel estéril, onde se removeu o fluido do interior do canal radicular de cada elemento dentário.

Pode-se observar uma variação no número de pacientes por estudo entre 7 e 100, sendo que a mediana de pacientes estudados foi de 24.

De acordo com a análise dos estudos que utilizaram o método de cultura microbiana, foram isoladas 195 cepas microbianas, que pertenciam a 119 espécies. Observou-se um discreto predomínio de bactérias anaeróbias estritas (57%) sobre as bactérias anaeróbias facultativas (41,4%), sendo que fungos foram raramente isolados (1,6%). Considerando-se as espécies mais frequentemente isoladas, observa-se *Enterococcus faecalis*, seguido de *Gemella morbillorum*, *Popionibacterium acnes*, *Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus* spp, *Streptococcus constelattus*, *Streptococcus mitis* e *Veillonella* spp. Houve um predomínio de bactérias Gram-positivas (69,9%). No **Apêndice A** estão descritas todas as espécies microbianas encontradas nos estudos.

Tabela 3 – Microrganismos descritos nos estudos e perfil microbiano das amostras avaliadas através do método de cultura microbiana.

Estudo (Ano)	Bactérias		Fungos	Coloração	
	An. Estritos	An. Facultativos		Gram +	Gram -
Signoretti et al. (2013)	31	8	0	27	12
Anderson et al. (2012)	4	13	0	14	3
Vidana et al. (2010)	1	7	0	5	3
Gomes et al. (2008)	1	0	0	1	0
Gomes et al. (2005)	2	0	0	0	2
Gomes et al. (2004)	14	8	0	14	8
Pinheiro et al. (2003 a)	6	7	0	10	3
Pinheiro et al. (2003 b)	22	16	1	27	11
Peciulienė et al. (2000)	0	1	0	1	0
Sundqvist et al. (1998)	7	8	1	14	1
Molander et al. (1998)	14	6	1	10	10
Gomes et al. (1996)	4	3	0	5	2
Número de espécies	106	77	3	128	55
Percentual de espécies	57%	41,4%	1,6%	69,9%	30,1%

O método de estudo que envolve análise de ácidos nucleicos mais frequentemente empregado foi o a Reação em Cadeia da Enzima Polimerase (PCR). Foram estudadas 182 espécies diferentes. Observou-se um predomínio de detecção de anaeróbios estritos e microrganismos Gram-negativos. Fungos foram pouco investigados nos estudos, sendo que apenas 3 deles os avaliaram. As espécies *Enterococcus* spp., *Treponema maltophilum*, *Prevotella baroniae* e *Prevotella oralis* foram detectadas com frequência. Estes resultados estão descritos em detalhe na **Tabela 4** e no **Apêndice B**.

Tabela 4 – Estudos que avaliaram a microbiota de canais radiculares através dos métodos moleculares, microrganismos detectados e perfil microbiano dos achados.

Estudo (Ano)	Técnica Molecular	Bactérias		Fungos	Coloração	
		An. Estr.	An. Facultat.		Gram +	Gram -
Nobrega et al. (2013)	Nested PCR	8	0	0	0	8
Gomes et al. (2012)	PCR	4	0	0	0	4
Anderson et al. (2012)	PCR	6	6	1	6	6
Roças e Siqueira. (2012)	PCR	6	3	0	6	3
Wang et al. (2012)	PCR-DGGE	18	5	0	8	15
Chugal et al. (2011)	PCR-DGGE	5	4	0	3	6
Jiang et al. (2009)	RT-PCR	ND	ND	ND	ND	ND
Cavrini et al. (2008)	PCR	1	0	0	0	1
Roças et al. (2008)	PCR	10	2	1	8	4
Gomes et al. (2008)	Nested PCR	1	0	0	1	0
Sakamoto et al. (2008)	PCR	41	24	0	30	35
Gomes et al. (2006)	PCR	3	0	0	1	2
Gomes et al. (2005)	PCR	4	0	0	0	4
Foschi et al. (2005)	PCR	4	1	0	1	4
Kaufman et al. (2005)	PCR	0	1	0	1	0
Siqueira et al. (2005)	PCR	ND	ND	ND	ND	ND
Roças et al. (2004)	PCR-DGGE	0	1	0	1	0
Siqueira e Roças (2004)	Multiplex PCR	15	2	1	7	10
Siqueira e Rôças (2003)	PCR	1	0	0	1	0
Hashimura et al. (2001)	PCR	3	0	0	3	0
Rolph et al. (2001)	PCR	8	4	0	10	2
Número de espécies		138	53	3	87	104
Percentual de espécies		72%	27%	1%	45,5%	54,5%

Quando se analisa de forma simultânea os achados descritos nas **Tabelas 3** e **4** e nos **Apêndices A** e **B**, a espécie mais frequente isolada/detectada nos estudos foi *Enterococcus faecalis* (14/30 estudos). Outras microrganismos compreendem as espécies *Fusobacterium nucleum*, *Prevotella nigrescens*, *Propionibacterium acnes*, *Gemella morbillorum*, *Prevotella intermedia*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Streptococcus spp* e *Treponema denticola*. O número total de espécies relatadas nos estudos foi de 230.

DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo revisar os relatos da literatura que avaliaram a composição microbiana em dentes que apresentam infecções associadas ao insucesso do tratamento endodôntico que utilizaram técnicas de cultura e moleculares de identificação microbiana. Justifica-se esta proposta em razão do papel significativo do entendimento de aspectos microbiológicos, incluindo aspectos patogênicos, taxonômicos, morfológicos e ecológicos, uma vez que as bactérias são os principais microrganismos envolvidos na patogênese apical (HARGREAVES; COHEN, 2011).

Ainda de acordo com Hargreaves e Cohen (2011), investigar bactérias remanescentes nos canais radiculares na etapa de obturação permite avaliar as espécies que tem potencial de modular desfecho do tratamento. Os microrganismos que permanecem no interior do sistema de canais radiculares provavelmente participarão da etiologia da doença persistente (resultado já estabelecido) (HARGREAVES e COHEN, 2011). Estudos anteriores utilizando métodos de cultura revelaram na infecção secundária, uma flora microbiana distintamente diferente da infecção primária, sendo assim, essencial para promover melhores estratégias de tratamento que buscam erradicar os microrganismos presentes (SIQUEIRA JUNIOR; RÔÇAS, 2009; SIQUEIRA JUNIOR, 2002).

O elevado número de exclusões dos 731 artigos encontrados inicialmente nesta revisão, explica-se pela dificuldade de encontrar estudos realizados conforme os critérios de inclusão do presente estudo: ensaios clínicos realizados *in vivo*, com amostras coletadas em dentes de seres humanos e escritos em língua inglesa, durante o período estabelecido. Muitos estudos foram excluídos pois abordam a identificação de perfis bacterianos presentes em infecções primárias e, também, foram encontrados estudos onde se realizou revisão de literatura.

A identificação da microbiota endodôntica pode ser realizada por métodos de cultura e moleculares. Dentre estes dois métodos encontrou-se com maior frequência no presente estudo artigos que empregaram métodos moleculares para investigação dos microrganismos. Observou-se que 21 estudos avaliaram as amostras por meio de métodos moleculares e 12 por métodos de cultura.

A investigação dos microrganismos tem sido tradicionalmente realizada

por métodos de cultura microbiológica, ratificando os resultados encontrados neste estudo, os quais demonstram que métodos de cultura foram mais utilizados até o ano de 2000.

Método de cultura é o processo de cultivo de microrganismos no laboratório através do fornecimento, a esses microrganismos, dos nutrientes necessários e das condições físico-químicas apropriadas, incluindo temperatura, umidade, atmosfera, concentração de sal e pH (SIQUEIRA JUNIOR; RÔÇAS, 2005). Essencialmente a análise da cultura envolve as seguintes etapas: coleta e transporte da amostra, dispersão, diluição, cultivo, isolamento e identificação. As amostras endodônticas são coletadas e transportadas ao laboratório em um meio de preservação anaeróbico sem suporte. A seguir, elas são dispersas por sonificação ou vórtex, diluídas, distribuídas em vários tipos de meios de ágar e cultivadas em condições aeróbicas ou anaeróbicas. Após um período adequado de incubação, as colônias individuais são subcultivadas e identificadas com base nos múltiplos aspectos baseados em fenótipos, incluindo a morfologia da colônia e das células, o padrão de coloração Gram, a tolerância ao oxigênio, a caracterização bioquímica e a análise metabólica do produto final por cromatografia gás-líquido (HARGREAVES; COHEN, 2011).

Os métodos de cultura têm como vantagens uma natureza de amplo espectro, permite a análise de aspectos relacionados à fisiologia das cepas microbianas e garante a realização de testes laboratoriais de suscetibilidade dos microrganismos (SIQUEIRA JUNIOR; RÔÇAS, 2005). Entretanto, como limitações deste método, pode-se destacar a impossibilidade de cultivar todas as espécies pois nem todas as bactérias viáveis podem ser recuperadas, existem células que não estão mais viáveis, além da necessidade de um grande número de equipamentos e recursos; ainda, são necessários diversos dias ou semanas para identificação da maioria dos anaeróbicos (HARGREAVES; COHEN, 2011; SIQUEIRA JUNIOR; RÔÇAS, 2005).

De acordo com Rôças et al. (2004), a fim de evitar limitações do método de cultura, métodos que estudam sequências de ácidos nucléicos surgiram para alcançar uma descrição mais abrangente dos microrganismos envolvidos nesse processo.

As abordagens moleculares para identificação microbiana se baseiam em

certos genes que contém informações reveladoras sobre a identidade microbiana. O gene 16S rRNA (ou 16S rDNA) tem sido o mais amplamente utilizado porque ele é universalmente distribuído entre as bactérias, é suficientemente longo para conter alto teor de informações e curto o suficiente para ser facilmente sequenciado, possui regiões conservadas e variáveis, e oferece confiabilidade (GOMES; MONTAGNER, 2010). De forma semelhante, o gene 18S rRNA de fungos e outros eucariotas também tem sido extensivamente utilizado para a identificação desses organismos. O gene 16S rRNA de quase todas as espécies bacterianas em um dado ambiente, incluindo bactérias ainda não cultivadas e não caracterizadas, pode ser amplificado pela reação em cadeia da polimerase (HARGREAVES; COHEN, 2011; SIQUEIRA JUNIOR; RÔÇAS, 2005). O emprego dessa metodologia permitiu a caracterização de espécies antes desconhecidas, bem como da diversidade do genótipo das cepas de uma mesma espécie, além da identificação de fungos (PETERS et al., 1995; KALFAS et al., 2001).

A microbiota endodôntica foi aperfeiçoada e redefinida por métodos moleculares. Recentemente, não apenas os achados obtidos através dos métodos baseados em cultura foram confirmados, mas eles também têm sido suplementados com os achados obtidos a partir de técnicas de biologia molecular independente de cultura (ANDERSON et al., 2012; TORABINEJAD; WALTON, 2010; GOMES; MONTAGNER, 2010).

Sendo assim, pode-se destacar estudos que utilizaram a associação de ambos os métodos: Anderson et al. (2012), Gomes et al. (2008) e Gomes et al. (2004). Esta associação justifica-se pelos métodos moleculares, apesar de terem alta especificidade e sensibilidade, terem limitações em relação a impossibilidade de detectar a viabilidade microbiana e a grande maioria dos testes detectam as espécies-alvo. Já os métodos convencionais de cultura, tem baixa sensibilidade, porém detectam grande quantidade de espécies (HARGREAVES; COHEN, 2011). Segundo Anderson et al. (2012), a associação dos métodos torna-se importante pois combinando abordagens diferentes de identificação, revela-se novos patógenos endodônticos.

Uma ampla diversidade de microrganismos foi identificada em dentes com insucesso no tratamento endodôntico. Após a análise dos resultados, observou-se um predomínio de microrganismos anaeróbios estritos e Gram-positivos. De acordo

com Chavez De Paz et al. (2003), quando bactérias resistem ao tratamento há predomínio de bactérias gram-positivas, por isso caracterizam-se por serem mais resistentes a medidas de tratamentos antimicrobianos e se adaptarem as condições ambientais severas presentes em canais radiculares submetidos à instrumentação e à medicação. A parede celular de microrganismos Gram-positivos é mais espessa, tendendo a oferecer uma maior resistência aos agentes de desinfecção do sistema de canais radiculares (KONEMAN et al., 2008). Estas espécies apresentam ainda outros mecanismos de proteção, tais como bombas de e fluxo de íons que regulam as trocas osmóticas entre o interior e o exterior celular (EVANS et al., 2002). A análise das amostras por meio de métodos moleculares demonstrou a presença de um número elevado de microrganismos anaeróbios estritos (71,9%) em relação aos anaeróbios facultativos (26,5%). Uma das possíveis explicações seria que os pesquisadores selecionaram sondas de DNA que buscavam identificar anaeróbios estritos e Gram-negativos.

O número de estudos que relatou a presença de fungos nos canais radiculares foi pequeno. Quando se utilizou o método de cultura, fungos foram identificados por Pinheiro et al. (2003 b), Sundqvist et al. (1998) e Molander et al. (1998). Métodos moleculares identificaram fungos em estudos realizados por Anderson et al. (2012), Rôças et al. (2008) e Siqueira Junior e Rôças (2004).

Os estudos que utilizaram métodos de cultura e identificaram fungos, não relataram ser este o principal objetivo e inclusive não utilizarem meios de cultura específicos para estas espécies. Entretanto, dentre os estudos que utilizaram métodos moleculares, Rôças et al. (2008) empregou sondas de DNA específicas com o objetivo de identificar *Candida albicans*. Segundo Pinheiro et al. (2003 b), embora os fungos não têm sido geralmente encontrado em canais radiculares com infecção primária, a sua presença é mais comum em infecções persistentes após a instrumentação do canal radicular, provavelmente como resultado de contaminação durante o tratamento. Nair et al. (1990) relata ainda que estas espécies podem ser encontradas em dentes com tratamento endodôntico e lesões periapicais resistentes à terapia.

Os estudos clínicos que avaliam a microbiota em dentes com insucesso do tratamento endodôntico apresentaram uma variação grande no número de pacientes. Destaca-se ainda pequeno número de pacientes utilizado na maioria dos

estudos, sendo o número médio aproximado de 24 indivíduos. Este número se justifica devido à dificuldade durante a seleção dos pacientes e ao custo elevado dos procedimentos laboratoriais de análise das amostras. Assim, ratifica-se a necessidade da realização de revisões de literatura amplas que permitem a análise de um número de casos maior. Entretanto, deve-se considerar que a composição microbiana em canais radiculares infectados pode ser modificada por diversos fatores, especialmente a localização geográfica de origem da amostra (SIQUEIRA JUNIOR et al., 2008).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente revisão de literatura apresentou a evolução do entendimento das características da infecção microbiana em dentes portadores de infecções secundárias e persistentes. As recentes abordagens utilizando técnicas de biologia molecular e a associação destas com o cultivo microbiano contribuíram para uma identificação mais abrangente.

Demonstrou-se um predomínio de microrganismos anaeróbios estritos e gram-positivos. Porém, este resultado pode ser sugestivo, uma vez que alguns autores selecionaram métodos específicos para identificação de determinados tipos de bactérias.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, P.V. Recognition and prevention of failures in clinical dentistry Endodontics. **Ann. R. Australas. Coll. Dent. Surg.**, Sydney, v. 11, p. 150-166, Oct. 1991.

ANDERSON, A.C. et al. Comprehensive analysis of secondary infections Dental Root Canal: a combination of culture and Culture-Independent Approaches Reveals New Insights. **Plos One**, San Francisco, v. 7, no. 11, e49576, Nov. 2012.

BENENATI, F. W.; KHAJOTIA, S. S. A radiographic recall evaluation of 894 endodontic cases treated in a dental school setting. **J. Endod.**, New York, v. 28, no. 5, p. 391-395, May. 2002.

CAVRINI, F. et al. Detection of *treponema denticola* in root canal systems in primary and secondary endodontic infections. A correction with clinical symptoms. **New. Microbiol.**, Pavia, v. 31, no. 1, p. 67-73, Jan. 2008.

CHÁVEZ DE PAZ, L. E. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. **J. Endod.**, New York, v.33, no. 6, p. 652-662, June 2007.

CHÁVEZ DE PAZ, L. E. et al. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.36, no. 7, p.500-508, July 2003.

CHEUNG, G.S. Endodontic failures – changing the approach. **Int. Dent. J.**, Chichester, v.46, no. 3, p.131-138, June 1996.

CHUGAL, N. et al. Molecular characterization of microbial flora residing in the apical portion of infected root canals of human teeth. **J. Endod. Out.**, New York, v.37, no. 10, p. 1359-1364, Oct. 2011.

DRUCKER, D.B; GOMES, B.P; LILLEY, J.D. Role of anaerobic species in endodontic infection. **Clin. Infect. Dis.**, Oxford, v. 25, Suppl. 2, p. s220-221, Sept. 1997.

EVANS, M. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **Int. Endod. J.**, Chichester, v. 35, no. 3, p. 221-228, Mar. 2002.

FOSCHI, F. et al. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. **Oral. Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 20, no. 5, p. 289-295, Oct. 2005.

FOUAD, A.F. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 40, no. 9, p. 3.223-3.231, Sept. 2002.

GARCÍA, C.C. The post endodontic periapical lesion: histologic and etiopathogenic aspects. **Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal.**, Valencia, v. 12, no. 8, p. E585-590, Dec. 2007.

GOMES, B. P.; MONTAGNER, F. O papel do diagnóstico molecular no estudo das infecções de origem endodôntica: conceitos, técnicas e aplicações. In: Profa. Dra. Patrícia H. P. Ferrari; Prof. Dr. Antonio Carlos Bombana. (Org.). *A Infecção Endodôntica e sua Resolução*. 1ed. São Paulo: Livraria Santos, 2010, v. 1, p. 23-45.

GOMES, B.P. Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. **J. Endod.**, New York, v. 32, no. 10, p.937-940, Oct. 2006.

GOMES, B.P.; LILLEY, J.D.; DRUCKER, D.B. Clinical dental microflora of root canals. **J. Dent.**, v. 24, no. 1-2, p. 47-55, Jan-Mar. 1996.

GOMES, B.P; ENDO, M.S; MARTINHO, F.C. Comparison of Endotoxin Levels Found in Primary and Secondary Endodontic Infections. **J. Endod.**, New York, v. 38, no. 8, p. 1082-1086. Aug. 2012.

GOMES, B.P. et al. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. **Oral. Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 20, no. 4, p. 211-215, Aug. 2005.

GOMES, B.P. et al. *Gemella morbillorum* in primary and secondary/persistent endodontic infections. **Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 105, no. 4, p. 519-525, Apr. 2008.

GOMES, B.P. et al. Microbiological examination infected dental root canals. **Oral. Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 19, no. 4, p. 71-76, Apr, 2004.

GOYMERAC, B; WOOLLARD, G. Focal infection: a new perspective on an old theory. **Gen. Dent.**, Chicago, v. 52, no. 4, p. 357-361, July-Aug. 2004.

HARGREAVES, K.M; COHEN, S. Caminhos da polpa. 10. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HASHIMURA, T.; SATO, M.; HOSHINO, E. Detection of *Slackia exigua*, *Mogibacterium timidum* and *Eubacterium saphenum* from pulpal and periradicular samples using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. **Int. J. Endod.**, Oxford, v. 34, no. 6, p. 463 – 470, Sept. 2001.

IWAHARA, K. Detection cfxA cfxA2 and the beta-lactamase gene of *Prevotella spp.* infection in clinical samples of dentoalveolar by real-time PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 44, no. 1, p. 172-176, Jan. 2006.

JIANG, Y.T. et al. Preliminary study of the presence and association of bacteria and archaea in teeth with apical periodontitis. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 42, no. 12, p. 1096-1103, Dec. 2009.

JOE editorial board. Obturation of the Root Canal System: An Online Study Guide. **J Endod**, New York, v. 34, Suppl. 5, p. e37-e43, May. 2008.

JUNG, I.Y. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. **J. Endod.**, New York, v. 26, no. 10, p. 599-604, Oct. 2000.

KALFAS, S; FIGDOR, D; SUNDQVIST, G. A new bacterial species associated with failed endodontic treatment: identification and description of *Actinomyces radidentis*. **Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 92, no. 2, p. 208-214, Aug. 2001.

KAUFMANN, B. et al. *Enterococcus* spp. in endodontically treated teeth with and without periradicular lesions. **J. Endod.**, New York, v. 31, no. 12, p. 851-856, Dec. 2005.

KIMURA, Y. et al. Histological examination of experimentally infected root canals after preparation by Er: YAG laser irradiation. **Lasers. Med. Sci.**, Londres, v. 26, no. 6, p. 749-754, Nov. 2011.

KONEMAN, E.W. et al. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 1565.

LOPES, H. P., SIQUEIRA JUNIOR, J. F. Endodontia: biologia e técnica. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2010.

LOVE, R.M; FIRTH, N. Histopathological profile of surgically removed persistent periapical radiolucent lesions of endodontic origin. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 42, no. 3, p. 198- 202, Mar. 2009.

LOVE, R.M. Bacterial adhesins their role in tubule invasion and endodontic disease. **Aust. Endod. J.**, Richmond, v. 28, no. 1, p. 25-28, Apr. 2002.

LOVE, R.M.; JENKINSON, H.F. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.**, Alexandria, v. 13, no. 2, p. 171-183, Mar. 2002.

MOLANDER, A. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **Int. J. Endod.**, Oxford, v. 3, no. 1, p. 1-7, Jan. 1998.

NAIR, P. N. (1999). Persistent periapical radiolucencies of root filled human teeth, failed endodontic treatments and periapical scars. **Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 87, no. 5, p. 617–627, May. 1999.

NAIR, P.N. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. **Periodontol. 2000.**, Copenhagen, v. 13, p. 121-148, Feb. 1997.

NAIR, P.N. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.**, Alexandria, v. 15, no. 6, p. 348-381, Nov. 2004.

NAIR, P.N. Non-microbial etiology: foreign body reaction maintaining post-treatment apical periodontitis. **Endod. Topics.** Oxford, v. 6, p. 114-134, Nov. 2004

NAIR, P.N. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions for: a long-term light and electron

microscopic follow-up study. **J. Endod.**, New York, v. 16, no. 12, p. 580-588, Dec. 1990.

NOBREGA, L.M. Treponema diversity in root canals with endodontic failure. **Eur. J. Dent.**, Ankara, v. 7, no.1, p. 61-68, Jan. 2013.

PECULIENE, V. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population 2000, **J. Endod.**, New York, v. 26, no. 10, p. 593-595, Dec. 2000.

PETERS, L. B.; WESSELINK, P. R.; MOORER, W. R. The fate and the role of bacteria left in root dentinal tubules. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 28, no. 2, p. 95-99, Mar. 1995.

PINHEIRO, E.T. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. **Oral. Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 18, no. 2, p. 100-103, Apr. 2003a.

PINHEIRO, E.T. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **Int. J. Endod.**, Oxford, v. 36, no. 1, p. 1-11, 2003b.

READER, C.M; BONIFACE, M; BUJANDA-WAGNER, S. Refractory endodontic lesion associated with *Staphylococci aureus*. **J. Endod.** New York, v. 20, no. 12, p. 607-609, Dec. 1994.

RICUCCI, D; SIQUEIRA JR.; J.F. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. **J. Endod.** New York, v. 36, no. 8, p. 1277-1288, Aug. 2010.

RÔÇAS, I.N; HULSMANN, M.; SIQUEIRA JUNIOR., J.F. Microorganisms in Root Canal treated Teeth from a German Population. **J. Endod.**, New York, v. 34, no. 8, p. 926-931. Aug. 2008.

RÔÇAS, I.N; SIQUEIRA JR, J.F. Detection of antibiotic resistance genes in samples from acute and chronic endodontic infections and after treatment. **Biol. Arch. Oral.** Oxford, v. 58, no. 9, p. 1123 – 1128; Sept. 2013.

RÔÇAS, I.N; SIQUEIRA JR, J.F. Microbiota characterization of teeth root canal treated with disease post. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 50, no. 5, p. 1721-1724, May. 2012.

RÔÇAS, I.N; Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial communities associated with failed endodontic treatment. **Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 98, no. 6, p. 741-749, Dec. 2004.

ROLPH, H.J. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, no. 9, p. 3282-3289, Sept. 2001

SAITO, D; LEONARDO, R.T; RODRIGUES, J.L; TSAI, S.M; HOFLING, J.F; GONÇALVES, R.B. Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries. **J. Med. Microbiol.**, Edinburgh, v. 55, no. 1, p. 101-107. Jan. 2006.

SAKAMOTO, M. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. **Oral. Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 22, no. 1, p. 19-23, Feb. 2007.

SAKAMOTO, M; SIQUEIRA JR, J.F; RÔÇAS, I.N; BENNO, Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. **Oral. Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 23, no. 4, p. 275-81, Aug. 2008.

SIGNORETTI, F.G. Investigation of cultivable bacteria isolated from longstanding retreatment resistant lesions of teeth with apical periodontitis. **J. Endod.**, New York, v. 39, no. 10, p.1240-1244, Oct. 2013.

SIQUEIRA JUNIOR., JF. The etiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 34, no. 1, p. 1-10, Jan. 2001 a.

SIQUEIRA JUNIOR, J.F. Polymerase chain reaction detection of *Treponema denticola* in endodontic infections within root canals. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 34, no. 4, p. 280-284, June 2001 b.

SIQUEIRA JUNIOR., J. F. Endodontic infections: Concepts, paradigms and perspectives. **Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 94, no. 3, p. 281-93, Sept. 2002.

SIQUEIRA, J.F. et al. Comparison 16S rDNA PCR-based grid and DNA-DNA hybridization for the detection of pathogens selected endodontic. **J. Med. Microbiol.**, Edinburgh, v. 51, no. 12, p. 1090-1096. Dez. 2002 a.

SIQUEIRA JUNIOR., J.F. et al. Direct amplification of rRNA gene sequences for identification of selected oral pathogens in root canal infections. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 35, no. 4, p. 345 – 351, Apr. 2002 b.

SIQUEIRA JUNIOR, J.F.; RÔÇAS, I.N. Polymerase chain detection of *Propionibacterium propionicus* and *Actinomyces radicidentis* in primary and persistent endodontic infections. **Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 96, no. 2, p. 215-222, Aug. 2003.

SIQUEIRA JUNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Polymerase chain reaction based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 97, no. 1, p. 85-94, Jan. 2004

SIQUEIRA JUNIOR, J.F; RÔÇAS, I.N; ROSADO, A.S. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to the analysis of endodontic infections. **J. Endod.**, New York, v. 31, no. 11, p. 775-782, Nov. 2005.

SIQUEIRA JUNIOR., J.F.; RÔÇAS, I.N. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. **J. Endod.**, New York, v. 31, no. 6, p. 411-423, June 2005.

SIQUEIRA JUNIOR., J.F. et al. Profiling of root canal bacterial communities associated with chronic apical periodontitis from Brazilian and Norwegian subjects. **J. Endod.**, New York, v. 34, no. 12, p. 1457-1461, Dec. 2008.

SIQUEIRA JUNIOR, J.F. Microbiology of apical periodontitis. In: ØRSTAVIK, D; PITT FORD, T. (Ed.). Essential endodontology. UK: Blackwell Munksgaard, 2008, p. 135-196.

SIQUEIRA JUNIOR, J.F.; RÔÇAS, I.N. Diversity of endodontic microbiota revisited. **J. Dent. Res.**, Thousand Oaks, v. 88, no. 11, p. 969-981, 2009.

SIQUEIRA JUNIOR, J.F. et al. Relationship between Fcγ receptor and interleukin-1 gene polymorphisms and post-treatment apical periodontitis. **J. Endod.**, New York, v. 35, no. 9, p. 1186-1192, Sept. 2009.

SIREN, E.K. et al. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. **Int. Endod. J.** Oxford, v. 30, no. 2, p. 91-95, Mar. 1997.

SUNDE, P.T. et al. Assessment of periradicular microbiota by DNA-DNA hybridization. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v. 16, no. 5, p. 191-196, Oct. 2000.

SUNDQVIST, G. Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora. **Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 78, no. 4, 522-530; Oct. 1994.

SUNDQVIST, G; FIGDOR, D; PERSSON, S; SJOGREN, U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. **Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 85, no. 1, p. 86-93, Jan. 1998.

VIDANA, R. SULLIVAN, A; BILLSTROM, H; AHLQUIST, M; LUND, B. *Enterococcus faecalis* infection in root canals – host derive dor exogenous source ? **Lett Appl Microbiol.**, Oxford, v. 52, no. 2, p. 109-115, Feb. 2010.

WALTON, R. E.; TORABINEJAD, M. **Princípios e prática em endodontia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010

WANG, J; JIANG, Y; CHEN, W; ZHU, C; LIANG, J. Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. **J. Endod.**, New York, v. 38, no. 7, p. 954-959, July 2012.

WANG, X. et al. Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. **J. Endod.**, New York, v. 36, no. 1, p. 56-63; Jan. 2010

ZEHNDER, M. et al. Chelation in root canal therapy reconsidered. **J. Endod.**, New York, v. 31, no. 11, p. 817-820, Nov. 2005.

ZEHNDER, M; GUGGENHEIM, B. The mysterious appearance of enterococci in filled root canals. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 42, no. 4, p. 277-287, Apr. 2009.

APÊNDICE A – Microorganismos descritos nos estudos através do método de cultura microbiana.

Estudo (Ano)	Microorganismos
Signoretti et al. (2013)	<i>Gemella morbillorum</i> (E+) <i>Propionibacterium acnes</i> (E+) <i>Actinomyces naeslundii</i> (F+) <i>Propionibacterium propionicum</i> (E+) <i>Bacteroides ureolyticus</i> (E+) <i>Eubacterium limosum</i> (F+) <i>Prevotella oralis</i> (E-) <i>Anaerococcus prevotii</i> (E+) <i>Gemella haemolysans</i> (E+) <i>Micrococcus spp</i> (F+) <i>Parvimonas micra</i> (E+) <i>Gemella spp</i> (E+) <i>Staphylococcus xylosus</i> (E+) <i>Streptococcus constellatus</i> (F+) <i>Actinomyces meyeri</i> (E+) <i>Eggerthella lenta</i> (E+) <i>Clostridium difficile</i> (E+) <i>Clostridium spp</i> (E+) <i>Clostridium acetobutylicum</i> (E+) <i>Clostridium bifermentans</i> (E+) <i>Clostridium tyrobutyricum</i> (E+) <i>Clostridium botulinum</i> (E+) <i>Neisseria meningitidis</i> (E-) <i>Neisseria cinerea</i> (E-) <i>Veillonella spp</i> (E-) <i>Stenotrophomonas matophilia</i> (F-) <i>Capnocytophaga spp</i> (F-) <i>Bacteroides fragilis</i> (E+) <i>Bacteroides ureolyticus</i> (E+) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (F-) <i>Pseudomonas luteola</i> (F-) <i>Porphyromonas endodontalis</i> (E-) <i>Prevotella oralis</i> (E-) <i>Fusobacterium nucleatum</i> (E-)

Haemophilus parainfluenzae(F-)

Anderson et al. (2012)

Enterococcus faecalis(F+)
Streptococcus spp(F+)
Propionibacterium acnes(E+)
Neisseria elongata(F-)
Actinomyces oris(F+)
Corynebacterium minutissimum(F+)
Proteus hauseri/vulgaris(F-)
Rummeliibacillus(F+)
Parvimonas micra(E+)
Streptococcus oralis(F+)
Streptococcus salivarius(F+)
Lactobacillus fermentum(F+)
Dialister invisus(E-)
Rummeliibacillus stabekisii(F+)
Streptococcus mutans(F+)
S. parasanguinis(F+)
Rothia dentocariosa(F+)

Chugal et al. (2011)

Fusobacterium nucleatum ssp.animalis(E-)
Fusobacterium nucleatum spp(E-)
Actinomyces spp(E+)
Anaeroglobus geminatus(E-)
Pseudoramibacter alactolyticus(E+)
Enterococcus faecalis(F+)
Pseudomonas spp(F-)
Burkholderia(F-)
Comamonadaceae(F-)

Vidana et al. (2010)

Enterococcus faecalis(F+)
Streptococcus spp(F+)
Staphylococcus spp(F+).
Lactobacillus spp(F+)
Actinomyces spp(E+)
Enterobacter spp(F-)

	<i>Pseudomonas spp</i> (F-) <i>Acinetobacter baumannii</i> (F-)
Gomes et al. (2008)	<i>Gemella morbillorum</i> (E+)
Gomes et al. (2005)	<i>Prevotella intermedia</i> (E-) <i>Prevotella nigrescens</i> (E-)
Gomes et al (2004)	<i>Peptostreptococcus micros</i> (E+) <i>Peptostreptococcus prevotii</i> (E+) <i>Fusobacterium necrophorum</i> (E-) <i>Prevotella intermedia</i> (E-) <i>Prevotella nigrescens</i> (E-) <i>Streptococcus constellatus</i> (F+) <i>Enterococcus faecalis</i> (F+) <i>Streptococcus anginosus</i> (F+) <i>Streptococcus sanguis</i> (F+) <i>Gemella morbillorum</i> (E+) <i>Streptococcus mitis</i> (F+) <i>Porphyromonas gingivalis</i> (E-) <i>Prevotella loescheii</i> (E-) <i>Propionibacterium acnes</i> (E+) <i>Prevotella buccae</i> (E-) <i>Actinomyces naeslundii</i> (F+) <i>Peptostreptococcus magnus</i> (E+) <i>Prevotella denticola</i> (E-) <i>Peptostreptococcus sacharolyticus</i> (E+) <i>Prevotella melaninogenica</i> (E-) <i>Staphylococcus lentus</i> (F+) <i>Streptococcus salivarius</i> (F+)
Pinheiro et al. (2003 a)	<i>Enterococcus faecalis</i> (F+) <i>Streptococcus sanguis</i> (F+) <i>Streptococcus mitis</i> (F+)

Streptococcus constelattus(F+)
Peptostreptosococcus prevotti(E+)
Peptostreptosococcus micros(E+)
Prevotella buccae(E-)
Actinomyces naeslundii(F+)
Gemella morbillorum(E+)
Staphylococcus lentus(F+)
Fusobacterium necrophrum(E-)
Veillonella spp(E-)
Lactobacillus acidophilus(F+)

Pinheiro et al. (2003 b)

Enterococcus faecalis(F+)
Enterococcus faecium(F+)
Streptococcus constellatus(F+)
Streptococcus sanguis(F+)
Streptococcus mitis(F+)
Streptococcus anginosus(F+)
Streptococcus mutans(F+)
Streptococcus oralis(F+)
Streptococcus salivarius(F+)
Peptostreptococcus prevotii(E+)
P. micro (E+)
Peptostreptococcus magnus(E+)
Peptostreptococcus saccharolyticus(E+)
Actinomyces naeslundii(F+)
Actinomyces odontolyticus(E+)
Actinomyces viscosus(E+)
Prevotella buccae(E-)
Prevotella intermedia(E-)
Prevotella nigrescens(E-)
Prevotella melaninogenica(E-)
Prevotella corporis(E-)
Prevotella loescheii(E-)
Propionibacterium acnes(E+)
Propionibacterium propionicum(E+)
Gemella morbillorum(E+)
Veillonella spp(E-)

Fusobacterium necrophorum(E-)
Fusobacterium nucleatum(E-)
Fusobacterium spp(E-)
Lactobacillus acidophilus(F+)
Staphylococcus lentus(F+)
Haemophilus aphrophilus(F-)
Eubacterium lentum(E+)
Bifidobacterium spp(E+)
Clostridium subterminale(E+)
Lactococcus lactis(F+)
Lactococcus cremoris(F+)
Capnocytophaga spp(F-)
Candida spp(FUNGO)

Peciuliene et al (2000)

Enterococcus faecalis(F+)

Sundqvist et al. (1998)

Enterococcus faecalis(F+)
Streptococcus anginosus(F+)
Streptococcus constellatus(F+)
Streptococcus intermedius(F+)
Streptococcus mitis(F+)
Streptococcus parasanguis(F+)
Peptostreptococcus micros(E+)
Actinomyces israelii(E+)
Pseudoramibacter alactolyticus(E+)
Eubacterium timidum(F+)
Lactobacillus catenaforme(F+)
Propionibacterium acnes(E+)
Propionibacterium propionicum(E+)
Fusobacterium nucleatum(E-)
Bacteroides gracilis(E+)
Candida albicans(FUNGO)

Molander et al. (1998)	<i>Enterococcus spp</i> (F+) <i>Streptococcus spp</i> (F+) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (F+) <i>Lactobacillus spp</i> (F+) <i>Actinomyces spp</i> (F+) <i>Bacillus spp</i> (F+) <i>Escherichia coli</i> (F-) <i>Citrobacter freundii</i> (F-) <i>Klebsiella spp</i> (F-) <i>Enterobacter agglomerans</i> (F-) <i>Proteus spp</i> (F-) <i>Pseudomonas spp</i> (F-) <i>Peptostreptococcus spp</i> (E+) <i>Propionibacterium spp</i> (E+) <i>Lactobacillus spp</i> (F+) <i>Eubacterium alactolyticum</i> (E+) <i>Veillonella spp</i> (E-) <i>Fusobacterium spp</i> (E-) <i>Prevotella spp</i> (E-) <i>Wolinella spp</i> (F-) <i>Candida albicans</i> (FUNGO)
Gomes et al. (1996)	<i>Propionibacterium</i> (E+) <i>Prevotella</i> (E-) <i>Peptostreptococcus</i> (E+) <i>Eubacterium</i> (E+) <i>Estreptococcus</i> (F+) <i>Lactobacilos</i> (F+) <i>Actinomicetos</i> (F-)

(E): Anaeróbios Estritos; (F): Anaeróbios Facultativos; (+): Gram-positivos; (-): Gram-negativos.

APÊNDICE B - Microrganismos descritos nos estudos através de métodos moleculares.

Estudo (Ano)	Microrganismos
Nobrega et al. (2013)	<i>Treponema denticola</i> (E-) <i>Treponema maltophilum</i> (E-) <i>Treponema médium</i> (E-) <i>Treponema socranskii</i> (E-) <i>Treponema pectinovorum</i> (E-) <i>Treponema vicentii</i> (E-) <i>Treponema lecithinolyticum</i> (E-) <i>Treponema amylovorum</i> (E-)
Gomes et al. (2012)	<i>Prevotella nigrescens</i> (E-) <i>Fusobacterium nucleatum</i> (E-) <i>Treponema denticola</i> (E-) <i>Treponema socranskii</i> (E-)
Anderson et al. (2012)	<i>Enterococcus gallinarum/casseliflavus</i> (F+) <i>Candida parapsilosis</i> (FUNGO) <i>Lactobacillus gasseri</i> (E+) <i>Proteus hauseri/vulgaris</i> (F-) <i>Streptococcus mutans</i> (F+) <i>Peptostreptococcus stomatis</i> (E+) <i>Selenomonas spp</i> (E-) <i>Olsenella profusa</i> (E+) <i>Delftia spp</i> (F-) <i>Exiguobacterium aurantiacum</i> (F+)

	<i>Pantoea agglomerans</i> (F-)
	<i>Neisseria</i> (E-)
	<i>Phocaeicola abscessos</i> (E-)
Roças e Siqueira (2012)	<i>Propionibacterium acnes</i> (E+)
	<i>Fusobacterium nucleatum</i> (E-)
	<i>Streptococcus species</i> (F+)
	<i>Propionibacterium acidifaciens</i> (E+)
	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> (E+)
	<i>Enterococcus faecalis</i> (F+)
	<i>Tannerella forsythia</i> (E-)
	<i>Bacteroides</i> (E+)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (F-)
Wang et al. (2012)	<i>Porphyromonas endodontalis</i> (E-)
	<i>Capnocytophaga gingivalis</i> (F-)
	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> (E+)
	<i>Firmicutes sp.oral</i> (E-)
	<i>Dialister invisus</i> (E-)
	<i>Bilophila wadsworthia</i> (E-)
	<i>Propionibacter sp.oral</i> (E+)
	<i>Propionibacterium propionicus</i> (E+)
	<i>Actinomyces sp.oral</i> (E+)
	<i>Streptococcus mitis</i> strain(F+)
	<i>Atopobium spp</i> (E+)
	<i>Burkholderia spp</i> (F-)
	<i>Neisseria sp.oral</i> (F-)
	<i>Selenomonas sp.oral</i> (E-)
	<i>Prevotella oralis</i> (E-)
	<i>Spirochaeta spp</i> (E-)
	<i>Prevotella denticola</i> (E-)
	<i>Prevotella nigrescens</i> (E-)
	<i>Prevotella sp. oral</i> (E-)
	<i>Veillonellaceae bacterium</i> oral(E-)
	<i>Neisseria bacilliformis</i> (F-)
	<i>Bifidobacterium dentium</i> strain(E+)

Jiang et al. (2009)	<i>Archaea</i>
Cavrini et al. (2008)	<i>Treponema denticola</i> (E-)
Roças et al. (2008)	<i>Streptococcus spp</i> (F+) <i>Lactobacillus spp</i> (F+) <i>Dialister Invisus</i> (E-) <i>Eubacterium infirmum</i> (E+) <i>Prevotella intermédia</i> (E-) <i>Selenomonas sputigena</i> (E-) <i>Synergistes</i> (E-) <i>Treponema denticola</i> (E-) <i>Filifactor alocis</i> (E+) <i>Tannerella forsythia</i> (E-) <i>Solobacterium moorei</i> (E+) <i>Candida albicans</i> (FUNGO) <i>Treponema socranskii</i> (E-)
Gomes et al. (2008)	<i>Gemella morbillorum</i> (E+)
Sakamoto et al. (2008)	<i>Actinobacteria</i> (F+) <i>Actinomyces naeslundii</i> (F+) <i>Actinomyces radingae</i> (F+) <i>Actinomyces sp. Oral</i> (F+) <i>Atopobium rimae</i> (E+) <i>Bifidobacterium sp. oral</i> (E+) <i>Corynebacterium durum</i> (F+) <i>Corynebacterium sp. oral</i> (F+) <i>Olsenella genomosp</i> (E+) <i>Olsenella uli</i> (E+) <i>Propionibacterium sp. oral</i> (E+) <i>Bacteroidetes</i> (E-) <i>Bacteroidales oral</i> (E-) <i>Bacteroidetes oral</i> (E-)

Flavobacteriaceae genomosp(E-)
Porphyromonas gingivalis(E-)
Prevotella baroniae(E-)
Prevotella denticola(E-)
Prevotella nigrescens(E-)
Prevotella oris(E-)
Tannerella forsythia(E-)
Tannerella sp. Oral(E-)
Bacteroidetes bacterium(E-)
Saprosiraceae bacterium(F-)
Firmicutes(E+)
Clostridiales oral(E+)
Dialister invisus(E-)
Dialister sp. Oral(E-)
Enterococcus faecalis(F+)
Enterococcus sp. Oral(F+)
Eubacteriaceae oral(F+)
Eubacterium sp. Oral(E+)
Eubacterium yurii(E+)
Lachnospiraceae oral(E+)
Peptostreptococcus stomatis(E+)
Peptostreptococcus sp. oral(E+)
Pseudoramibacter alactolyticus(E+)
Selenomonas sp. oral(E-)
Shuttleworthia satelles(E+)
Solobacterium sp. oral(E+)
Streptococcus constellatus(F+)
Streptococcus mutans(F+)
Streptococcus oralis(F+)
Streptococcus pyogenes(F+)
Streptococcus sanguinis(F+)
Streptococcus sp. oral(F+)
Veillonella sp. oral(E-)
Fusobacterium nucleatum(E-)
Fusobacterium sp. oral(E-)
Proteobacteria(E-)
Brevundimonas diminuta(E-)
Burkholderiales sp. oral(E-)

	<i>Campylobacter showae</i> (E-)
	<i>Dechlorospirillum spp</i> (E-)
	<i>Escherichia sp. Oral</i> (F-)
	<i>Mesorhizobium amorphae</i> (E-)
	<i>Paracoccus sp. oral</i> (F-)
	<i>Petrobacter succinimandens</i> (F-)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (F-)
	<i>Pseudomonas putida</i> (F-)
	<i>Pseudomonas sp. Oral</i> (F-)
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (F-)
	<i>Terra haemophilus aromaticivorans</i> (F-)
	<i>Synergistes</i> (E-)
	<i>Synergistes sp. Oral</i> (E-)
Gomes et al. (2006)	<i>Filifactor alocis</i> (E+)
	<i>Tanarella forsythia</i> (E-)
	<i>Treponema denticola</i> (E-)
Gomes et al. (2005)	<i>Prevotella intermedia</i> (E-)
	<i>Prevotella nigrescens</i> (E-)
	<i>Porphyromonas gingivalis</i> (E-)
	<i>Porphyromonas endodontalis</i> (E-)
Foschi et al. (2005)	<i>T. forsythensis</i> (E-)
	<i>Treponema denticola</i> (E-)
	<i>Prevotella intermedia</i> (E-)
	<i>Porphyromonas gingivalis</i> (E-)
	<i>Enterococcus faecalis</i> (F+)
Kaufman et al. (2005)	<i>Enterococcus faecalis</i> (F+)
Siqueira et al. (2005)	<i>Archea</i>
Roças et al. (2004)	<i>Enterococcus faecalis</i> (F+)

Siqueira et al. (2004)	<i>Enterococcus faecalis</i> (F+) <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> (E+) <i>Propionibacterium propionicum</i> (E+) <i>Filifactor alocis</i> (E+) <i>Dialister pneumosintes</i> (E-) <i>Streptococcus spp</i> (F+) <i>Tannerella forsythensis</i> (E-) <i>Campylobacter rectus</i> (E-) <i>Porphyromonas gingivalis</i> (E-) <i>Treponema denticola</i> (E-) <i>Fusobacterium nucleatum</i> (E-) <i>Prevotella intermedia</i> (E-) <i>Candida albicans</i> (FUNGO) <i>Campylobacter gracilis</i> (E-) <i>Porphyromonas endodontalis</i> (E-) <i>Peptostreptococcus micros</i> (E+) <i>Actinomyces israelii</i> (E+) <i>Prevotella nigrescens</i> (E-)
Siqueira Jr e Rôças (2003)	<i>Propionibacterium propionicum</i> (E+) <i>Actinomyces radidentis</i> (E+)
Hashimura et al. (2001)	<i>Slackia exígua</i> (E+) <i>Mogibacterium timidum</i> (E+) <i>Eubacterium saphenum</i> (E+)
Rolph et al. (2001)	<i>Actinomyces israelii</i> (E+) <i>Eubacterium spp</i> (E+) <i>Lactobacillus acidophilus</i> (F+) <i>Peptostreptococcus micros</i> (E+) <i>Peptostreptococcus prevotii</i> (E+) <i>Porphyromonas endodontalis</i> (E-)

Streptococcus intermedius(F+)

Streptococcus mitis(F+)

Streptococcus oralis(F+)

Veillonella spp(E-)

Propionibacterium acnes(E+)

Propionibacterium granulosum(E+)

(E): Anaeróbios Estritos; (F): Anaeróbios Facultativos; (+): Gram-positivos; (-): Gram-negativos.