

## Identificación de microorganismos por reacción en cadena de la polimerasa en necrosis pulpar y periodontitis apical

### Identification of microorganisms by polymerase chain reaction in pulp necrosis and apical periodontitis

Leonardo Francisco López Arias,<sup>I</sup> Purificación Varela Patiño,<sup>I</sup> Rafael Seoane Prado,<sup>II</sup> Benjamín Martín Biedma,<sup>I</sup> José Domingo González Bahillo,<sup>I</sup> Karen Rodríguez Peña<sup>I</sup>

<sup>I</sup> Facultad de Odontología, Universidad de Santiago de Compostela. Galicia, España.

<sup>II</sup> Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología. Universidad de Santiago de Compostela. Galicia, España

---

#### RESUMEN

**Objetivos:** identificar, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, diez especies bacterianas procedentes de conductos radiculares necróticos, así como analizar su asociación con signos y síntomas de la periodontitis apical (dolor, exudado y movilidad), dentro de un área geográfica específica, Santiago de Compostela (noroeste de España).

**Métodos:** se realizó un estudio descriptivo, en un plazo de recogida de muestras de un año. Se extrajeron 43 muestras de los conductos radiculares necróticos, a razón de una muestra por pacientes, quienes fueron examinados previamente para determinar la presencia de periodontitis apical radiográfica, de la cual fueron descritos sus signos y síntomas. Se utilizaron puntas de papel absorbentes estériles y se procedió a extraer de dichas muestras el ADN por medio de la técnica del fenol-cloroformo. El producto se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, usando cebadores específicos para diez microorganismos. El resultado se visualizó por medio de electroforesis, utilizando un transiluminador UV. Los resultados se analizaron estadísticamente, para así establecer qué microorganismos estaban presentes de forma individual y cuáles se presentaron formando asociaciones como el llamado *red complex*, en relación con los signos y síntomas presentes en la periodontitis apical.

**Resultados:** *Fusobacterium nucleatum* fue el microorganismo con presencia de forma individual más frecuente (83,72 % de las muestras). En cuanto al estudio de la asociación de los microorganismos con los signos y síntomas, *Porphyromonas endodontalis* presentó una asociación significativa con respecto al exudado ( $p < 0,05$ ) y movilidad ( $p < 0,05$ ). En cambio, *Enterococcus* spp. y *Treponema denticola* ( $p < 0,01$ ) presentaron ambos una asociación significativa con respecto al dolor. En cuanto a la incidencia del *red complex* fue de 6 casos en total.

**Conclusiones:** *Fusobacterium nucleatum* y *Streptococcus* spp. son los microorganismos identificados con mayor porcentaje en comparación a los restantes estudiados. *Porphyromonas endodontalis* es el microorganismo con mayor asociación estadística con respecto a los signos y síntomas de la periodontitis apical.

**Palabras clave:** extracción de ADN; microbiología endodóntica; PCR; periodontitis apical; endodoncias necróticas.

---

## ABSTRACT

**Objectives:** identify by polymerase chain reaction technique ten bacterial species obtained from necrotic root canals, and analyze their association with signs and symptoms of apical periodontitis (pain, exudate and mobility) in a specific geographic area: Santiago de Compostela (northwestern Spain).

**Methods:** a descriptive study was conducted based on a one-year sample collection period. Forty-three samples were taken from necrotic root canals, at a rate of one sample per patient, who had been previously examined for radiographic apical periodontitis, of which the signs and symptoms were described. Sterile absorbent paper points were used to extract the DNA samples, applying the phenol-chloroform technique. The product was amplified by polymerase chain reaction, using specific primers for ten microorganisms. The result was visualized by electrophoresis using a UV transilluminator. Outcomes were analyzed statistically to determine which microorganisms were present individually and which formed associations such as the so-called red complex, according to the signs and symptoms present in the apical periodontitis.

**Results:** *Fusobacterium nucleatum* was the most common individual microorganism (83.72 % of the samples). As to the association of microorganisms with signs and symptoms, *Porphyromonas endodontalis* was found to be significantly associated with exudate ( $p < 0.05$ ) and mobility ( $p < 0.05$ ), while both *Enterococcus* spp. and *Treponema denticola* ( $p < 0.01$ ) had a significant association with pain. Incidence of the red complex was 6 cases in all.

**Conclusions:** *Fusobacterium nucleatum* and *Streptococcus* spp. were the microorganisms identified as displaying the highest percentages. *Porphyromonas endodontalis* showed the greatest statistical association with signs and symptoms of apical periodontitis.

**Keywords:** DNA extraction; endodontic microbiology; PCR; apical periodontitis; necrotic root canal therapy.

## INTRODUCCIÓN

La importancia de los microorganismos en el desarrollo de signos y síntomas presentes en las afecciones pulpares, es diversa y poco conocida.<sup>1</sup> La presencia de bacterias antes de sellar los conductos radiculares puede conducir al desarrollo de una periodontitis periapical.<sup>2</sup> Muchos autores han señalado que la presencia individual de un microorganismo específico puede llegar a determinar la existencia de signos y síntomas.<sup>3,4</sup> Sin embargo, *Zakaria* y otros<sup>5</sup> defienden que la asociación de varios microorganismos, a través de la creación de complejos microbianos, pueden ser los responsables del desarrollo de signos y síntomas presentes en las enfermedades pulpares.

Este estudio tiene como objetivos identificar por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), diez microorganismos presentes en necrosis pulpares en piezas con periodontitis apical radiográfica, y así poder determinar la relación entre la presencia de microorganismos de forma individual o a través del complejo microbiano *red complex* con la aparición de signos y síntomas caracterizados por el dolor, exudado y movilidad, que se manifiestan en la periodontitis apical.

## MÉTODOS

En el presente trabajo se utilizó una variante, la ubicación geográfica.<sup>6</sup> En este sentido fue elegida para llevar a cabo dicha investigación la ciudad de Santiago de Compostela (Noroeste de España), siendo esta un área específica fácil de controlar, con pocos habitantes (95 092 habitantes), y que cuenta con una Escuela de Odontología en la cual se realizó el estudio.

Se realizó un estudio descriptivo, con muestreo por conglomerados naturales. Para verificar la identificación de bacterias se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en vez del método de cultivo tradicional que ha sido considerado como el *gold standard*<sup>7</sup> con respecto a la metodología empleada en este trabajo. El método de cultivo presenta varias desventajas, tales como el largo tiempo requerido y la dificultad en la reproducción de las condiciones ambientales necesarias para el crecimiento microbiano. Por lo tanto, los resultados son con frecuencia poco fiables. Estos problemas se resuelven con el uso de técnicas genéticas, tales como hibridación o PCR, que solo requieren la extracción de ADN.<sup>8,9</sup> Al no existir ningún kit comercial para la extracción de ADN procedente de conductos radiculares, este estudio utilizó un protocolo modificado para la extracción de ADN a partir de sangre.

Los diez microorganismos seleccionados para su identificación fueron: *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus* spp., *Prevotella nigrescens*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas endodontalis*, *Tannerella forsythia* (basonym *Bacteroides forsythus*), *Enterococcus* spp., *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*.

La selección microbiana se basó en los criterios utilizados por *Fouad* y otros:<sup>7</sup> abundante presencia de microorganismos en conductos radiculares necróticos *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra* y *Streptococcus* spp.; microorganismos frecuentemente aislados en pacientes con síntomas presentes en infecciones endodónticas como *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis* y *Porphyromonas endodontalis*; microorganismos detectados en pacientes con fracaso endodóntico, *Enterococcus* spp.;

microorganismos presentes en pacientes con periodontitis severa, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia*; microorganismos identificados por PCR, en lesiones periapicales, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia*; identificación del *red complex* (formado por *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*). Dicho complejo se cree que es responsable de formas graves de enfermedad periodontal y la manifestación clara de signos y síntomas a nivel endodóntico.

## SUJETOS

Se procesaron 43 muestras procedentes de pacientes adultos que fueron remitidos a la Facultad de Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela para realizarles un tratamiento de conductos radiculares, con edades comprendidas entre 25 a 65 años de edad. Los criterios de selección fueron los siguientes: no existía un tratamiento endodóntico previo en dicha pieza dentaria, determinar la necrosis pulpar utilizando *spray* de cloruro de metilo (Endo ice, Colthene Whaledent<sup>®</sup>, y Un pulp tester 7005; analytic technology<sup>®</sup>), corroborar la presencia de periodontitis apical, la cual fue determinada por la visualización de una imagen radiolúcida periapical en una radiografía preoperatoria, utilizando el índice periapical (PAI).

Los pacientes fueron evaluados en busca de los signos y síntomas descritos y que están presentes en la periodontitis apical.

Fueron excluidos del estudio aquellos que habían recibido antibioticoterapia en los últimos 6 meses, si presentaban una enfermedad periodontal avanzada (incluyendo pérdida ósea superior al tercio medio radicular), o tenían lesiones endo-periodontales con un mal pronóstico. El consentimiento de todos los pacientes se obtuvo informando a los mismos de acuerdo con los protocolos del comité de ética de la Universidad de Santiago de Compostela, España.

## TÉCNICA DE MUESTREO

Se utilizó un dique de goma para proporcionar un aislamiento absoluto del campo de trabajo, antes de obtener la muestra. La corona del diente se desinfectó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % y NaClO al 2,5 % durante 30 s, antes de proceder a realizar la apertura cameral. Se realizó la permeabilización del conducto, para luego determinar la longitud de trabajo con la ayuda de una lima K estéril # 15 y # 20 (Dentsply Maillefer<sup>®</sup>, Ballaigues, Suiza) y la utilización de un localizador de ápices Root Zx (Morita<sup>®</sup>, California, USA). Para el muestreo microbiano, se utilizó una punta de papel estéril # 15, la cual se insertó a lo largo del conducto radicular sin instrumentar hasta llegar al ápice anatómico y se mantuvo allí durante 60 segundos. La punta de papel se introdujo entonces en un tubo de 2,0 mL (Eppendorf, Colonia, Alemania) que contiene 500 Lde solución tampón TE (2,2 g de NaCl diluido en 250 mL de H<sub>2</sub>O estéril, 1,5 g de TRIS diluido en 250 mL de H<sub>2</sub>O estéril, 7,3 g EDTA se diluyó en 250 mL de H<sub>2</sub>O estéril, todo a pH 7,6). Las muestras fueron congeladas a una temperatura de -20 ° C hasta su uso.

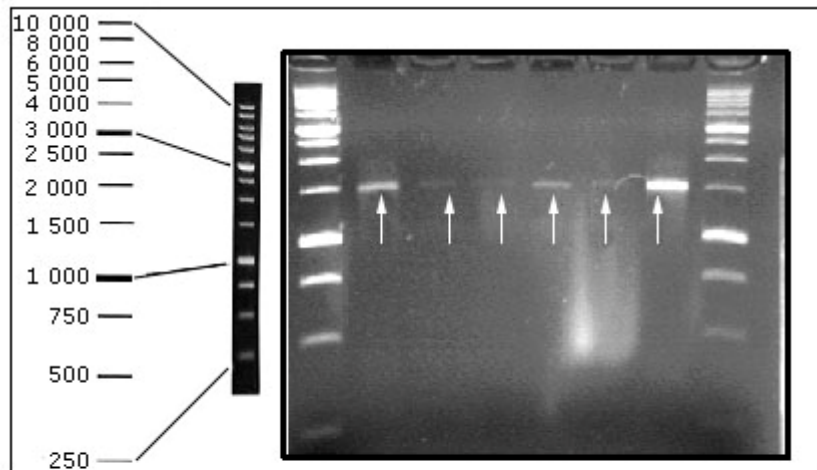
La extracción de ADN se realizó utilizando todo el protocolo de extracción en sangre por medio de la técnica del fenol-cloroformo.

#### AMPLIFICACIÓN POR MEDIO DE PCR

Para la amplificación de los ácidos nucleicos fueron utilizados los reactivos DyNAzyme II Kit™ ADN polimerasa, con la enzima recombinante (Fynnzymes, Keilaranta, Finlandia), y cebadores específicos para los microorganismos BioTeZ® (Biomedical Research; Campus Berlin-Buch, Alemania), a ello se añadió el ADN extraído procedente de las muestras.

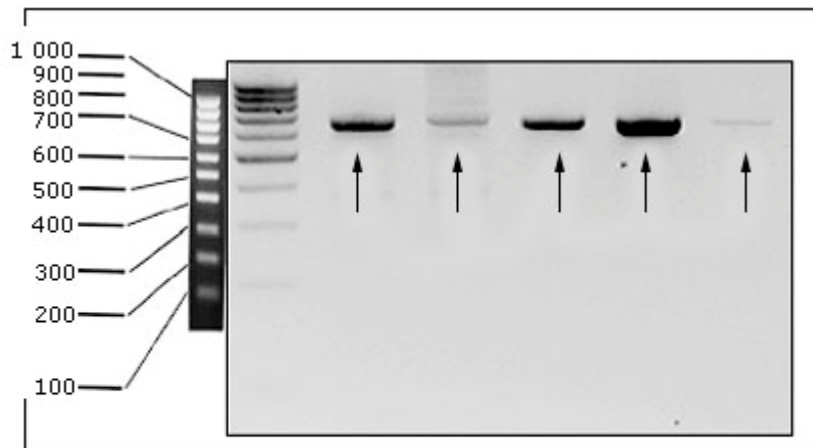
El protocolo para la amplificación de ácidos nucleicos requiere un volumen total de 50 µL que consta de: 31,5 µL H<sub>2</sub>O estéril; 5,0 µL DyNAzymer™ 10X *buffer*; 0,25 µL Finnzymes Taq polimerasa; 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 µM de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP); 0,5 µL DyNAzymer™ (sense y antisense) cebadores y 5 µL de la muestra de ADN. La mezcla final se transfirió a un tubo Eppendorf para PCR de 0,5 mL de capacidad, donde se añadieron dos gotas de aceite mineral estéril Perkin Elmer para evitar la evaporación durante el proceso en el termociclador (Peletir Applied Biosystems Foster City, CA, EE. UU.). Las condiciones de temperatura y número de ciclos para la PCR de los diez microorganismos han sido establecidos por la fábrica de reactivos ([http://diagnostics.finnzymes.fi/tm\\_determination.html](http://diagnostics.finnzymes.fi/tm_determination.html)) [consultado el 20 de febrero 2016]. Al mismo tiempo se llevaron a cabo una serie de controles positivos para la PCR de cada primer, utilizando el ADN de la American Type Culture Collection (ATCC), cepas de las especies bacterianas respectivas (GenBank n<sup>o</sup> de acceso. AB028369), a la vez que en la misma PCR se hizo correr una mezcla de amplificación sin ADN para obtener un control negativo, utilizando también el tiosulfato como un control de descontaminación.

Al final de la amplificación, las muestras se mantuvieron a una temperatura de 4 °C hasta su visualización por medio de electroforesis, la cual se realizó utilizando gel de agarosa al 2 % disuelto en TAE 1X y se tiñeron con 1 µg/µL de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Dos marcadores de escalera se utilizaron para los geles, 1 000 pb para el control del 16S rDNA (Fig. 1) y 100 pb para el producto amplificado de los microorganismos (Fig. 2). Nuestro protocolo de carga fue de 25 µL por carril, del cual correspondían a 20 µL del producto amplificado y 5 µL del tampón de carga. Se utilizó una fuente de energía (BioRad, Hercules CA, EE. UU.), conectada a una corriente estable de 100 V durante aproximadamente 45 min. El proceso de visualización y la recolección de imágenes se realizaron con un transiluminador UV conectado a un sistema de imagen digital (LABWORK, BioRad Molecular Analyst, California, EE. UU.).



La flechas indican las muestras positivas.

**Fig. 1.** Control positivo de 16S rRNA con un peso molecular de 1 500 bp, con 1 kb marcador molecular en cada lado.



**Fig. 2.** Muestras de *Prophyromonas endodontalis* amplificada con un peso molecular de 674 pb (flechas), junto con un *ladder* de 100 pb a la derecha. Gel tratado por un programa de visualización como muestra negativa.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los datos descriptivos de las variables continuas se expresan como una función de la media  $\pm$  DE. En la comparación de medias, se aplicó la prueba paramétrica de la t de Student, y en ausencia de normalidad de la distribución de los datos, se aplicó la prueba no paramétrica de la U de Mann-Whitney. Las asociaciones entre variables se estudiaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Los intervalos de confianza fueron a 95 %. Los valores estadísticamente significativos se definen en  $p < 0,05$ . Todos los análisis se realizaron utilizando el programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS, versión 14.0, SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

## RESULTADOS

La presencia de ADN bacteriano fue confirmada mediante la identificación del 16S rRNA, el cual se encontró en todas las muestras extraídas.

De los microorganismos aislados, el mayor porcentaje fue del 84 % para *Fusobacterium nucleatum*, seguido de *Streptococcus* spp. 74 %, *Prevotella nigrescens* 51 %, *Parvimonas micra* 46 %, *Porphyromonas endodontalis* 37 %, *Tannerella forsythia* (basonym *Bacteroides forsythus*) 35 %, *Enterococcus* spp. 30 %, *Treponema denticola* 25 %, *Porphyromonas gingivalis* 21 %, y, por último, *Prevotella intermedia* con un 12 % (Fig. 3).

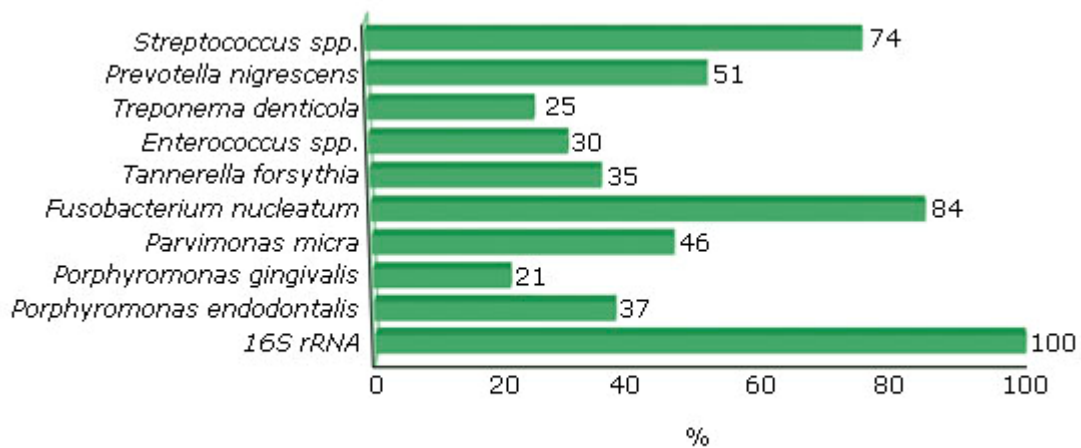


Fig. 3. Porcentaje identificativo de microorganismos presentes en periodontitis apical.

*Porphyromonas endodontalis* fue la que mostró mayor asociación estadística a seis microorganismos: *Porphyromonas gingivalis* 0,43 ( $p < 0,01$ ), *Fusobacterium nucleatum* 0,34 ( $p < 0,05$ ), *Tannerella forsythia* 0,45 ( $p < 0,01$ ), *Enterococcus* spp. 0,33 ( $p < 0,05$ ), *Treponema denticola* 0,54 ( $p < 0,001$ ) y *Prevotella intermedia* con 0,32 ( $p < 0,05$ ) (tabla 1).

*Porphyromonas endodontalis* se asoció con el exudado ( $p < 0,05$ ) y la movilidad ( $p < 0,05$ ). Se encontraron asociaciones significativas entre *Enterococcus* spp. ( $p < 0,05$ ) y *Treponema denticola* ( $p < 0,01$ ), con respecto al dolor (tabla 2).

En cuanto a la incidencia del *red complex* fue de 6 casos en total.

Tabla 1. Asociación entre los microorganismos

Microorganismos	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Parvimonas micra</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Tannerella forsythia</i>	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Treponema denticola</i>	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Streptococcus spp.</i>
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	** 0,43	0,25	* 0,34	** 0,45	* 0,33	*** 0,54	* 0,32	-0,21	-0,10
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0	-0,13	0,07	* 0,34	0,28	** 0,48	* 0,35	-0,06	0,04
<i>Parvimonas micra</i>		0	0,15	0,10	0,30	0,20	0,24	-0,02	0,01
<i>Fusobacterium nucleatum</i>			0	0,19	0,29	0,25	-0,03	-0,17	-0,11
<i>Tannerella forsythia</i>				0	0,26	*** 0,69	* 0,34	-0,06	-0,01
<i>Enterococcus spp.</i>					0	* 0,31	0,07	-0,06	0,15
<i>Treponema denticola</i>						0	** 0,45	0,04	0,22
<i>Prevotella intermedia</i>							0	-0,08	0,21
<i>Prevotella nigrescens</i>								0	0,17
<i>Streptococcus spp.</i>									0

\*\*\* p < 0,001; \*\* p < 0,01; \* p < 0,05.

Tabla 2. Asociación entre los microorganismos y los signos y síntomas de origen endodóntico

Microorganismos	Signos y síntomas		
	Dolor	Exudado	Movilidad
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	0,20	* 0,40	* 0,34
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0,14	-0,05	0,28
<i>Parvimonas micra</i>	0,14	0,20	0,07
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0,01	-0,07	-0,23
<i>Tannerella forsythia</i>	0,25	0,04	0,20
<i>Enterococcus spp.</i>	* 0,37	0,22	0,26
<i>Treponema denticola</i>	** 0,47	0,28	0,20
<i>Prevotella intermedia</i>	0,32	0,23	0,18
<i>Prevotella nigrescens</i>	-0,09	-0,11	-0,13
<i>Streptococcus spp.</i>	0,094	-0,04	-0,12

\*\* p < 0,01; \* p < 0,05.

## DISCUSIÓN

Entre los microorganismos identificados en este estudio, está presente *Fusobacterium nucleatum* con el porcentaje más alto (84 %). Esto, también se ha observado en otros estudios, que utilizaron métodos de cultivo o PCR.<sup>10,11</sup> Otro microorganismo que se aisló con presencia del 46 % en las muestras analizadas fue *Parvimonas micra*, con un porcentaje identificativo que no es similar con otros estudios realizados que presentaron porcentajes entre el 20 y 53 %.<sup>7,12</sup>



*Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens* son difíciles de diferenciar entre sí por medio de métodos de cultivo, pero no por PCR. Los resultados de otros autores concuerdan con los del presente estudio en relación con *P. nigrescens* que presenta un porcentaje identificativo más alto que *P. intermedia* en infecciones endodónticas.<sup>13,14</sup> Sin embargo, *Li* y otros.<sup>15</sup> reporta resultados diferentes a los nuestros, en los que la *P. intermedia* presenta un mayor porcentaje que *P. nigrescens*, esta variación puede deberse, a que dicha investigación incluyó dentición decidua.

La utilización de metodologías génicas, permitió identificar una gama más amplia de microorganismos y la asociación que se establece con síntomas presentes en la periodontitis apical entre los conductos radiculares necróticos. La aplicación de dicha metodología en microorganismos como *Tannerella forsythia* (basonym *Bacteroides forsythus*) y *Treponema denticola* permitió una clara identificación de los mismos, sobre todo este último que solo se detectó en infecciones endodónticas utilizando PCR. Se obtuvieron resultados similares en este estudio en comparación con los reportados por autores ya mencionados.<sup>10</sup>

En la mayoría de los casos de fracaso endodóntico, se han encontrado enterococos y eubacterias grampositivas, y en ocasiones también tanto hongos como bacterias del género *Candida*, *Parvimonas* y *Fusobacterium*.<sup>13</sup> Sin embargo, *Wang* y otros<sup>16</sup> establecieron a las bacterias de la familia *Enterococcus* spp. como responsable en el fracaso endodóntico. Entre esta familia las principales responsables son, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* por encontrarse más comúnmente. Para *Enterococcus* spp., el porcentaje identificativo fue 30,23 % similar a la media de 29-46 % descrito en otros estudios.<sup>4,7</sup>

El complejo bacteriano, formado por *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola* llamado *red complex* se cree que puede ser causante de formas graves de enfermedad periodontal y síntomas de origen endodóntico.<sup>17</sup> Este estudio se identificó al *red complex* en una cantidad similar a la observada por *Rocas* y otros,<sup>18</sup> quien reporta 4 sobre 50 casos. Sin embargo, en nuestro caso no podemos establecer una asociación significativa, entre dicho complejo microbiano con los signos y síntomas observados. *Buonavoglia* y otros.<sup>17</sup> manifiesta encontrar dolor espontáneo, sensibilidad a la percusión, exudado y dolor a la palpación en el 29,2 % de los casos, un resultado que también difiere con el presente estudio.

En este estudio se encontró que *Enterococcus* spp. y *Treponema denticola* se asocian con el dolor de origen dental, mientras que *Porphyromonas endodontalis* está asociada con el exudado y movilidad. Estos resultados muestran diferencias con el estudio llevado a cabo por *Lysakowska* y otros<sup>19</sup> que considera que *Streptococcus* spp. está fuertemente asociado con síntomas de origen endodóntico, sobre todo con respecto al exudado. Las discrepancias entre los estudios podrían explicarse por el hecho de que el estudio de *Lysakowska* y otros fue realizado por métodos de cultivo y no por medio de PCR.

También se ha informado que *P. gingivalis* se asocia con síntomas severos de endodoncia y la presencia de exudado.<sup>5</sup> Estos datos reportados no están en concordancia con los resultados encontrados en este estudio, pues *P. gingivalis* mostró una asociación débil a los signos y síntomas, con una ausencia estadística significativa de ( $p > 0,05$ ) (tabla 2).

Los microorganismos *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens* se han asociado a los síntomas de origen endodóntico.<sup>11</sup> Sin embargo, *Foaud* y otros<sup>7</sup> no puede establecer una asociación clara, o al menos estadísticamente, con los síntomas de origen endodóntico, a pesar de que se identificaron con frecuencia en sus muestras, tomadas de conductos radiculares con presencia de exudado.

Los resultados de este estudio sugieren que en la comparación con las variaciones en la identificación bacteriana detectadas en diferentes estudios, estas pueden estar sesgadas según la técnica empleada por el operador, o de no ser así tendremos que tener en cuenta otras variables, una de ellas podría ser la ubicación geográfica.<sup>6</sup>

En conclusión, *Fusobacterium nucleatum* y *Streptococcus* spp. son los microorganismos identificados con mayor porcentaje en comparación a los restantes estudiados. *Porphyromonas endodontalis* es el microorganismo con mayor asociación estadística con respecto a los signos y síntomas de la periodontitis apical.

### Conflictos de intereses

Los autores no declaran conflictos de intereses.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ricucci D, Candeirol GT, Bugea C, Siqueira JF Jr. Complex Apical Intraradicular Infection and Extraradicular Mineralized Biofilms as the Cause of Wet canals and Treatment Failure: Report of 2 cases. *J Endod.* 2016;42(3):509-15.
2. Ferreira NS, Martinho FC, Cardoso FG, Nascimento GG, Carvalho CA, Valera MC. Microbiological profile resistant to different intracanal medications in primary endodontic infections. *J Endod.* 2015;41(6):824-30.
3. Gomes BP, Berber VB, Kokaras AS, Chen T, Paster BJ. Microbiomes of Endodontic-Periodontal Lesions before and after Chemomechanical Preparation. *J Endod.* 2015;41(12):1975-84.
4. Zhang C, Hou BX, Zhao HY, Sun Z. Microbial diversity in failed endodontic root-filled teeth. *Chin Med J (Engl).* 2012;125(6):1163-8.
5. Zakaria MN, Takeshita T, Shibata Y, Maeda H, Wada N, Akamine A, et al. Microbial community in persistent apical periodontitis: a 16S rRNA gene clone library analysis. *Int Endod J.* 2015 Aug;48(8):717-28.
6. Qi Z, Cao H, Jiang H, Zhao J, Tang Z. Combinations of bacterial species associated with symptomatic endodontic infections in a Chinese population. *Int Endod J.* 2016;49(1):17-25.

7. Fouad AF, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R, et al. PCR-Based Identification of Bacteria Associated with Endodontic Infections. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3223-31.
8. Gomes GB, Sarkis-Onofre R, Bonow ML, Etges A, Jacinto RC. An investigation of the presence of specific anaerobic species in necrotic primary teeth. *Braz Oral Res.* 2013 Mar-Apr;27(2):149-55.
9. Rosa TP, Signoretti FG, Montagner F, Gomes BP, Jacinto RC. Prevalence of *Treponema* spp. in endodontic retreatment-resistant periapical lesions. *Braz Oral Res.* 2015;29.
10. Efenberger M, Agier J, Pawłowska E, Brzezińska-Błaszczyk E. Archaea prevalence in inflamed pulp tissues. *Cent Eur J Immunol.* 2015;40(2):194-200.
11. Gomes BP, Drucker DB, Lilley JD. Associations of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J.* 1994;27:291-8.
12. Provenzano JC, Rôças IN, Tavares LF, Neves BC, Siqueira JF Jr. Short-chain Fatty Acids in Infected Root Canals of Teeth with Apical Periodontitis before and after Treatment. *J Endod.* 2015;41(6):831-5.
13. Zhang C, Du J, Peng Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. *J Endod.* 2015;41(8):1207-13.
14. Marinho AC, Martinho FC, Leite FR, Nascimento GG, Gomes BP. Proinflammatory Activity of Primarily Infected Endodontic Content against Macrophages after Different Phases of the Root Canal Therapy. *J Endod.* 2015;41(6):817-23.
15. Li H, Guan R, Sun J, Hou B. Bacteria community study of combined periodontal-endodontic lesions using denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing analysis. *J Periodontol.* 2014 Oct;85(10):1442-9.
16. Wang QQ, Zhang CF, Chu CH, Zhu XF. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. *Int J Oral Sci.* 2012 Mar;4(1):19-23.
17. Buonavoglia A, Latronico F, Pirani C, Greco MF, Corrente M, Prati C. Symptomatic and asymptomatic apical periodontitis associated with red complex bacteria: clinical and microbiological evaluation. *Odontology.* 2013;101(1):84-8.
18. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR, Coelho AM. Red complex (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: a molecular approach. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91:468-71.

19. Lysakowska ME, Ciebiada-Adamiec A, Sienkiewicz M, Sokołowski J, Banaszek K. The cultivable microbiota of primary and secondary infected root canals, their susceptibility to antibiotics and association with the signs and symptoms of infection. Int Endod J. 2016 May;49(5):422-30.

Recibido: 5 de junio de 2016.

Aprobado: 1ro. de mayo de 2017.

*Leonardo Francisco López Arias.* Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Medicina y Odontología. Rua enterreros s/n 15782 Santiago de Compostela, Galicia, España. Correo electrónico: [franleola@hotmail.com](mailto:franleola@hotmail.com)