



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN
MEDICINA MOLECOLARE

CICLO XXXII

Studi di microbiologia endodontica: prevalenza di *Candida* spp. nei canali radicolari infetti ed azione antibatterica di due peptidi antimicrobici nei confronti di biofilm di *Enterococcus faecalis*

Coordinatore:

Chiar.ma Prof.ssa STEFANIA CONTI

Tutore:

Chiar.ma Prof.ssa MADDALENA MANFREDI

Dottorando: GIOVANNI MERGONI

A.A. 2016/2017 – 2018/2019

Sommario

Introduzione	3
Patologie endodontiche	4
Pulpite reversibile	6
Pulpite irreversibile.....	7
Necrosi pulpare.....	8
Parodontite apicale acuta.....	9
Parodontite apicale cronica.....	10
Osteite condensante	11
Ascesso apicale acuto	12
Ascesso apicale cronico.....	13
Microbiologia endodontica	14
Biofilm batterici.....	19
<i>Enterococcus faecalis</i>	22
<i>Candida</i> spp.....	24
Peptidi antimicrobici.....	28
Caratteristiche strutturali e meccanismo d'azione.....	28
Utilizzo di AMP in endodonzia.....	30
Pravalenza di <i>Candida</i> spp. nelle infezioni endodontiche: revisione sistematica e meta-analisi	34
Riassunto	34
Background.....	34
Materiali e metodi	37
Criteri di eleggibilità/ineleggibilità	37
Strategia di ricerca	38
Selezione degli articoli	38
Estrazione dei dati	39
Valutazione del rischio di bias.....	43
Metodi statistici della meta-analisi	44
Risultati	46
Discussione	64
Effetto antibatterico di due peptidi sintetici di derivazione anticorpale nei confronti del patogeno endodontico <i>Enterococcus faecalis</i>	68
Riassunto	68
Background.....	69
Materiali e metodi	72
Ceppo batterico.....	72
Terreni di coltura e tamponi	72
Mantenimento in coltura di cellule murine immortalizzate.....	72
Peptidi KP e L18R.....	73
Dischetti di idrossiapatite (HA).....	73
Idrossido di calcio.....	74
Valutazione dell'attività citotossica <i>in vitro</i> nei confronti di fibroblasti L929	74
Valutazione dell'attività di KP e L18R nei confronti di cellule di <i>E. faecalis</i> in stato planctonico.....	75
Valutazione dell'attività di KP e L18R nei confronti di biofilms di <i>E. faecalis</i>	76
Valutazione dell'attività di KP e L18R nei confronti di biofilms di <i>E. faecalis</i> sviluppati su dischetti di HA	77
Microscopia confocale a scansione laser	77
Microscopia elettronica a scansione	78
Analisi statistica.....	79

Risultati	80
Citotossicità di KP e L18R nei confronti di fibroblasti L929.....	80
Attività di KP e L18R contro <i>E. faecalis</i> in stato planctonico	80
Attività di KP E L18R contro biofilms di <i>E. faecalis</i>	81
Effetto di Ca(OH) ₂ , KP e L18R su biofilms di <i>E. faecalis</i> cresciuti su dischetti di HA. Analisi di microscopia confocale a scansione laser.	83
Effetto di Ca(OH) ₂ , KP e L18R su biofilms di <i>E. faecalis</i> cresciuti su dischetti di HA. Analisi di microscopia elettronica a scansione.	88
Discussione	93
Conclusioni	99
Bibliografia	104
Ringraziamenti.....	114

Introduzione

Le patologie endodontiche costituiscono un argomento significativo di salute pubblica rappresentando il motivo più frequente per il quale viene richiesta una visita odontoiatrica e la causa principale che porta all'estrazione di un elemento dentario (1, 2).

Studi epidemiologici hanno evidenziato come un dente su venti presenti una parodontite apicale (ossia una patologia infiammatoria dei tessuti periapicali del dente come conseguenza dell'infezione dell'endodonto) e un dente su dieci abbia ricevuto un trattamento endodontico (3).

Sorprendentemente il $36 \pm 10\%$ dei denti trattati endodonticamente presentano segni di parodontite apicale (3). La percentuale di successo del trattamento endodontico è 85%, mentre cala al 77 % per i ritrattamenti endodontici (4, 5). Nonostante i progressi della tecnica e delle conoscenze, la percentuale di successo delle terapie endodontiche non sembra essere aumentata in modo significativo negli ultimi 50 anni (5). Questi dati suggeriscono l'importanza della ricerca in ambito endodontico con l'obiettivo di migliorare le performance dei trattamenti e il comfort dei pazienti.

Più di un secolo fa Miller suggerì che l'origine delle patologie endodontiche e periapicali fosse riconducibile alla presenza di batteri all'interno del sistema canalare (6). Nel 1960 l'ipotesi dell'eziologia infettiva venne definitivamente confermata con gli studi classici di Kakehashi, il quale dimostrò che, in ratti germ-free, la malattia endodontica e periapicale non si sviluppa dopo esposizione pulpale, a differenza di quello che accadeva negli animali non gnotobiotici (7). Da allora una crescente mole di studi hanno approfondito gli aspetti di microbiologia endodontica, identificando i batteri che più frequentemente colonizzano il sistema canalare, verificando le modificazioni che avvengono nel corso della "maturazione" dell'infezione, individuando le basi microbiologiche che determinano i fallimenti dei trattamenti endodontici e individuando alcuni dei fattori di virulenza microbici in grado di determinare la patologia endodontica (8). Un notevole impulso alle conoscenze in questo campo è stato possibile grazie all'introduzione di tecniche molecolari per l'identificazione dei microrganismi nei canali infetti, ciò ha permesso di superare alcune delle limitazioni delle tecniche colturali, in particolare la possibilità di riconoscere

microrganismi non coltivabili o presenti in piccolo numero. Oltre ai batteri, altri microorganismi appartenenti a regni differenti potrebbero svolgere un ruolo importante nell'ecosistema delle infezioni endodontiche. La presenza di funghi, in particolare appartenenti al genere *Candida*, è stata spesso riscontrata all'interno di canali infetti (9).

Numerosi studi *in vitro* e *in vivo* hanno ampiamente dimostrato che le tecniche attuali di decontaminazione chemo-meccanica non sono in grado di eliminare completamente i microrganismi contenuti all'interno del sistema canalare (10, 11), ed è quindi necessario sviluppare nuove strategie al fine di ottimizzare le performances del trattamento endodontico.

L'obiettivo delle ricerche condotte nel corso del triennio di dottorato è stato quello di:

- calcolare la prevalenza cumulativa di *Candida* spp. nelle infezioni endodontiche attraverso una revisione sistematica della letteratura;
- valutare *in vitro* le proprietà antibatteriche di due peptidi antimicrobici di derivazione anticorpale, KP e L18R, nei confronti di un ceppo di *Enterococcus faecalis* di isolamento clinico, di riferimento, allo stato planctonico e di biofilm e di verificarne la citotossicità nei confronti di cellule eucariote.

Patologie endodontiche

Nella polpa dentale, in seguito ad un danno tissutale, si verifica una risposta infiammatoria che è tipica dei tessuti di tipo connettivale del nostro organismo, e che può essere acuta o cronica, a seconda della persistenza del danno (Figura 1).

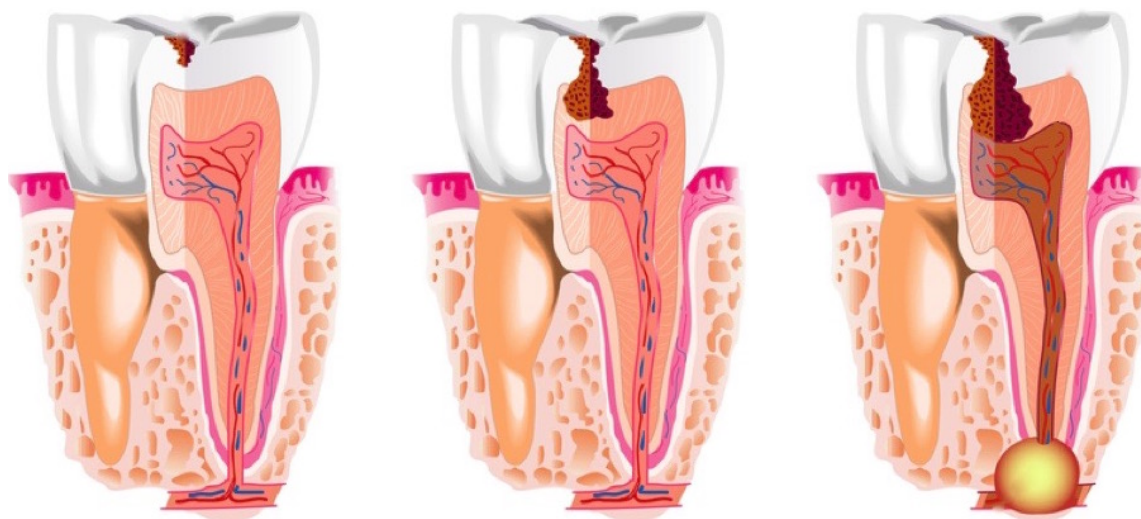


Figura 1 - Meccanismo di risposta pulpare e periradicolare all'invasione batterica in seguito a processo carioso.

Ciò che rende peculiare la reazione nel comparto pulpare è la localizzazione in una cavità dalle pareti rigide, la camera pulpare. In condizioni normali, la polpa e la dentina sono sterili e isolate dai microrganismi orali. Quando l'isolamento viene perso, i microrganismi possono invadere il sistema endocanalare attraverso diverse vie. La più frequente è quella dei tubuli dentinali comunicanti con l'esterno a causa di carie, fenomeni di usura o traumi acuti, oppure per esposizione del tessuto radicolare a causa della malattia parodontale (Figura 2). La colonizzazione di batteri provenienti dal letto vascolare, mediante il cosiddetto fenomeno dell'anacoresi, non è ancora del tutto dimostrata (12). La dentina per sua natura è una struttura permeabile, in quanto caratterizzata dalla presenza di tubuli dentinali che decorrono per tutta la sua lunghezza, partendo dal versante pulpare fino al versante rivolto allo smalto e al cemento. La loro permeabilità aumenta progressivamente in direzione della polpa, perché in questa zona la densità dei tubuli aumenta e perché il loro diametro tende a diminuire dalla polpa verso l'esterno. Il diametro più stretto raggiunto dai tubuli è circa di $0,9\ \mu\text{m}$. Dal momento che i batteri hanno un diametro compreso in un range di $0,2$ e $0,7\ \mu\text{m}$, il diametro dei tubuli è del tutto compatibile con l'ingresso dei batteri nel sistema canalare (13). Tuttavia, una volta esposta la dentina, l'ingresso dei microrganismi nelle polpe vitali è ostacolato da una serie di meccanismi protettivi tra i quali la pressione positiva all'interno dei tubuli dentinali che contrasta l'ingresso dei microbi nei tubuli stessi, la presenza del prolungamento odontoblastico che occupa

gran parte dello spazio intra-tubulare bloccando il transito dei microbi e la sclerosi difensiva che viene messa in atto dai tubuli se sottoposti a fattori irritanti determinando la riduzione del diametro dei tubuli coinvolti.

Una volta instauratosi lo stimolo infettivo/irritativo la polpa dentale va incontro a una serie progressiva di processi patologici, associati a specifiche caratteristiche cliniche e istologiche. La modalità e i tempi di progressione da uno stadio a quello successivo dipendono da diversi fattori, tra cui la durata dello stimolo, le caratteristiche del paziente, la virulenza degli agenti patogeni e le eventuali terapie effettuate.



Figura 2 - Elemento 41 in necrosi. L'ingresso dei microrganismi è avvenuto, presumibilmente, attraverso lo spazio parodontale. Radiograficamente si osserva la regressione della lesione dopo trattamento endodontico.

Pulpite reversibile

Per definizione, la pulpite reversibile è un'inflammatione della polpa di lieve entità. Solitamente, se il fattore causale viene eliminato, ad esempio proteggendo l'esposizione dentinale, l'inflammatione si risolve e la polpa riacquista una condizione di salute. Stimoli modesti come carie incipienti, erosioni cervicali o abrasioni occlusali, gran parte del procedure operative di preparazione dentale, curettage parodontale e fratture dello smalto con esposizione dei tubuli dentinali possono causare una

pulpite reversibile (14). In questo tipo di pulpite la sintomatologia è solitamente assente. Tuttavia, in alcuni casi, l'applicazione di stimoli freddi o caldi può produrre un dolore transitorio acuto. La rimozione di questi stimoli, che normalmente non determinano dolore o discomfort, esita in un sollievo immediato. Gli stimoli freddi e caldi producono diverse risposte al dolore nella polpa normale. Quando del calore viene applicato ai denti con polpa non infiammata, si riscontra una risposta iniziale ritardata; l'intensità del dolore aumenta con l'innalzarsi della temperatura. Al contrario, la risposta dolorifica al freddo nella polpa normale è immediata; l'intensità tende a diminuire se tale stimolo freddo permane (15). Sulla base di tali osservazioni, le risposte della polpa sana e di quella patologica risultano apparentemente associate a cambiamenti della pressione intrapulpale. La rimozione di fattori irritanti e la protezione dentinale solitamente determinano una diminuzione della sintomatologia e l'arresto del processo infiammatorio nel tessuto pulpare. In questo stadio la polpa va incontro ad alcune modificazioni sostanziali che consistono in un aumento di permeabilità vascolare e nella fuoriuscita di numerose cellule e di componenti plasmatici. Il rilascio di fattori chemiotattici determina il reclutamento di cellule della serie bianca e, gradualmente, con il progredire della distruzione del tessuto pulpare, i neutrofili vengono sostituiti da macrofagi, plasmacellule e linfociti (13).

Pulpite irreversibile

La pulpite irreversibile è spesso un'evoluzione di una pulpite reversibile. Per definizione, questo stadio patologico di infiammazione pulpare non tende a risolversi nonostante la rimozione degli agenti scatenanti. Raramente questo stadio è asintomatico, più frequentemente il paziente riferisce episodi di dolore spontaneo (assenza di stimoli esterni) intermittente o continuo (Figura 3).

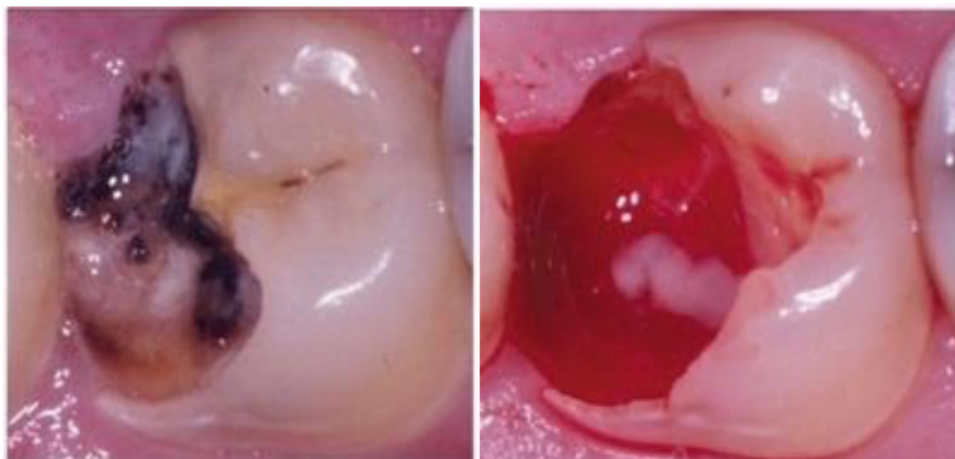


Figura 3 - Elemento 46 in uno stato di pulpite irreversibile sintomatica in seguito a processo carioso.

Il dolore di questo tipo di pulpite può essere acuto, sordo, localizzato o diffuso e può durare per minuti od ore. La localizzazione del dolore pulpale è meno precisa rispetto alla localizzazione del dolore di origine periradicolare e la sua identificazione diventa più difficile in rapporto all'intensificazione del dolore. L'applicazione di stimoli esterni come freddo o caldo può determinare un dolore di durata protratta (12). Di conseguenza, in presenza di dolore severo, le risposte pulpari differiscono da quelle che si ritrovano in denti non infiammati o con pulpite reversibile. L'applicazione di stimoli termici a denti con pulpite irreversibile può produrre una risposta immediata e di durata prolungata. In alcuni casi lo stimolo freddo e la conseguente vasocostrizione, determina una diminuzione della pressione pulpale e conseguente sollievo dal dolore. Se l'infiammazione è confinata e non coinvolge i tessuti periapicali, i denti rispondono in maniera normale alla palpazione e alla percussione. L'estensione dell'infiammazione al legamento parodontale causa sensibilità alla percussione e una migliore localizzazione del dolore. Per i denti con segni e sintomi di pulpite irreversibile è indicato il trattamento endodontico (13).

Necrosi pulpale

Da un'infiammazione acuta (pulpite) il tessuto può andare incontro a fenomeni di necrosi tissutale con la perdita della funzione. Come già ricordato, la polpa è racchiusa all'interno di pareti rigide, non possiede una circolazione collaterale e i vasi in essa contenuta tendono a collassare se sottoposti ad

un aumento di pressione. Pertanto, la pulpite irreversibile conduce, in un periodo di tempo variabile, a una necrosi colliquativa. Se l'essudato prodotto durante la pulpite irreversibile viene riassorbito o drena attraverso una carie o un'esposizione pulpare nell'ambiente orale, la necrosi è ritardata e la polpa radicolare ha la possibilità di rimanere vitale per molto tempo. Al contrario, la chiusura o la sigillatura della polpa infiammata induce rapidamente una necrosi pulpare totale (13). La necrosi pulpare è solitamente asintomatica ma si possono manifestare episodi di dolore spontaneo oppure fastidio o dolore alla pressione. Quest'ultimo sintomo è legato al coinvolgimento iniziale dei tessuti parodontali periapicali. Normalmente i denti necrotici non rispondono agli stimoli termici. Tuttavia, in alcuni casi, i pazienti possono lamentare dolore dopo l'applicazione di uno stimolo caldo: si suppone che ciò sia dovuto ad un'espansione termica dei gas presenti nel canale radicolare. La presenza di diversi gradi di risposta infiammatoria che vanno dalla pulpite reversibile alla necrosi può rendere difficoltosa l'interpretazione dei risultati ai vari test clinici nei denti con canali multipli. Inoltre, gli effetti della necrosi sono raramente confinati all'interno dei canali. Quindi, a causa della diffusione della risposta infiammatoria a livello dei tessuti periradicolari, i denti con polpa necrotica sono spesso sensibili alla percussione. La sensibilità alla palpazione rappresenta un ulteriore segnale di coinvolgimento periradicolare. Istologicamente, si osserva la formazione di microascessi, che gradualmente si estendono dalla porzione più coronale alla polpa radicolare con la conseguente graduale disintegrazione e liquefazione di tutta la massa tissutale. A causa dell'instensibilità della camera pulpare, l'edema produce iperalgesia, quindi una diminuzione della soglia di eccitabilità del tessuto e la fuoriuscita del contenuto infetto nell'area periapicale. La totale o parziale necrosi del tessuto pulpare e la velocità della totale degenerazione dipendono da molti fattori, ma prevalentemente dalla capacità di assorbire i fluidi organici che si formano e dalla carica batterica presente.

Parodontite apicale acuta

La parodontite apicale è caratterizzata da una reazione sintomatica da parte dei tessuti periapicali nei

confronti di una noxa patogena. Tra i fattori irritanti che possono determinare questo processo patologico ritroviamo i mediatori dell'infiammazione prodotti dalla polpa irreversibilmente infiammata o la fuoriuscita di tossine batteriche dalla polpa in necrosi, gli agenti chimici (come irriganti o agenti disinfettanti), restauri in iperocclusione, sovrastrumentazione ed estrusione di materiale da otturazione (13). Fra questi, i primi sono i più rilevanti. Le manifestazioni cliniche della parodontite apicale acuta consistono in un discomfort da moderato a severo, dolore alla masticazione o al contatto oclusale. Se il processo patologico deriva da una pulpite, i segni e sintomi includeranno una responsività al freddo, al caldo e al test elettrico. Se invece la patogenesi è correlata a una necrosi, i denti non daranno alcuna risposta ai test di vitalità. L'applicazione di pressione in genere determina un dolore marcato e lancinante. Radiologicamente si può osservare un ispessimento dello spazio del legamento parodontale (12).

Nella parodontite apicale acuta, i leucociti polimorfonucleati e i macrofagi sono visibili all'interno di un'area localizzata in prossimità dell'apice. Talvolta potrebbe essere presente una piccola area di necrosi colliquativa. La correzione oclusale (nei casi in cui ci sia evidenza di iperocclusione), la rimozione di irritanti, la pulpectomia, oppure il drenaggio dell'essudato periradicolare solitamente determinano un miglioramento clinico.

Parodontite apicale cronica

La parodontite apicale cronica si differenzia dalla forma acuta per la mancanza di sintomi. Questa condizione deriva da una necrosi pulpare ed è determinata dal passaggio di tossine batteriche e dei loro prodotti di degradazione negli spazi periapicali. Nell'ospite si osserva il reclutamento di cellule di difesa, volte a limitare la carica batterica e a rimuovere i cataboliti batterici e non batterici, determinando la formazione a livello apicale di un fenomeno, tipico delle infiammazioni, detto granuloma. Essendo i denti interessati in necrosi, questi non rispondono agli stimoli elettrici o termici, e la percussione determina un dolore lieve o assente. Talvolta si riscontra una leggera sensibilità alla palpazione, questo avviene quando vi è un'alterazione della corticale e un'estensione del processo

patologico ai tessuti molli. I reperti radiografici presentano quadri variabili, da una minima interruzione della lamina dura a un'estesa distruzione del tessuto periradicolare e intraradicolare (Figura 4) (15).

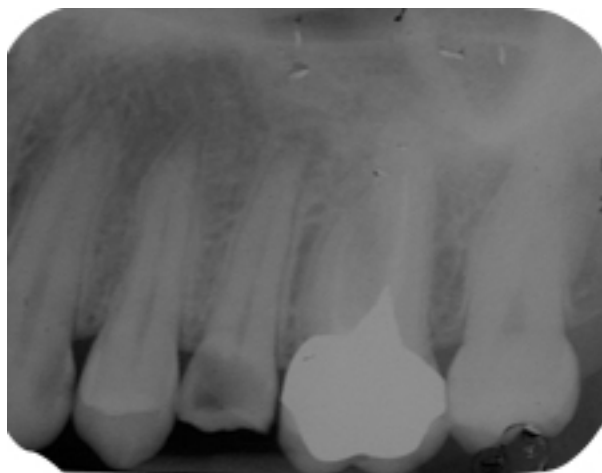


Figura 4 - Immagine radiografica di elemento 15 affetto da parodontite apicale cronica.

Istologicamente, le lesioni parodontali croniche sono classificate come granulomi o cisti. I granulomi periapicali sono formati da tessuto di granulazione infiltrato da mastociti, macrofagi, linfociti, plasmacellule, e occasionalmente leucociti polimorfonucleati. Si osservano frequentemente anche cellule giganti multinucleate, cellule schiumose, cristalli di colesterolo e cellule epiteliali. Le cisti radicolari possiedono una cavità centrale ripiena di un fluido eosinofilo o materiale semisolido sono rivestite da uno strato di cellule epiteliali squamose. L'epitelio è circondato da tessuto connettivo che contiene tutte le componenti cellulari che si ritrovano anche nel granuloma. L'origine di tale rivestimento epiteliale è legata alla presenza di residui della guaina epiteliale di Hertwig, i residui epiteliali del Malassez. Queste cellule sono portate a proliferare se sottoposte a uno stimolo infiammatorio (13). La rimozione degli irritanti, come la polpa necrotica e l'otturazione completa, solitamente, determinano una risoluzione della parodontite cronica.

Osteite condensante

L'osteite condensante è una variante della parodontite apicale cronica asintomatica, rappresentata un

aumento della componente ossea trabecolare in risposta a uno stimolo irritativo persistente. Questa lesione è solitamente localizzata attorno all'apice dei denti mandibolari posteriori, tuttavia, qualsiasi dente può essere interessato da questa patologia. L'osteite condensante può essere asintomatica o sintomatica. Gli stimoli elettrici, termici e pressori sono associati a risposte diverse in base alla vitalità della polpa allo stato infiammatorio dei tessuti periradicolari dei denti con osteite condensante. Radiograficamente, si osserva un'area di radiopacità diffusa periradicolare con andamento concentrico (Figura 5). Istologicamente si rileva una sclerosi dell'osso trabecolare con perdita della architettura lamellare. In alcuni casi è presente flogosi tissutale. Non sempre il trattamento endodontico, se indicato, determina la scomparsa dei segni radiografici (13).

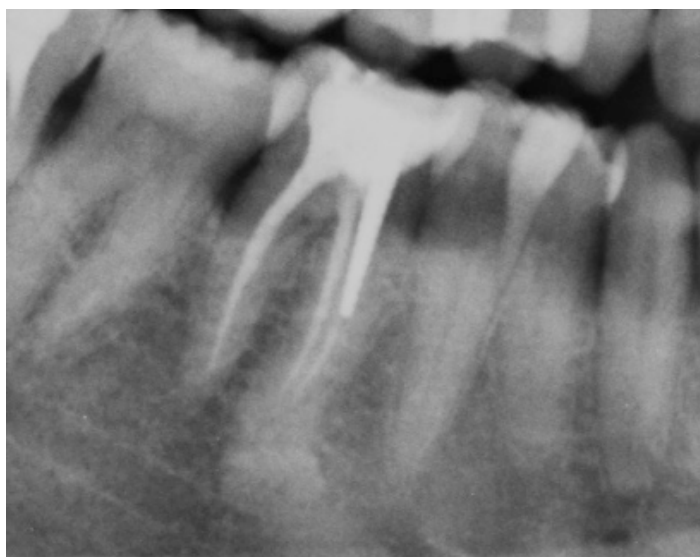


Figura 5 - Immagine radiografica di elemento 46 trattato endodonticamente ed affetto da osteite condensante.

Ascesso apicale acuto

L'ascesso apicale acuto è una lesione colliquativa, localizzata o diffusa, che distrugge i tessuti periradicolari (15). Consiste in una risposta infiammatoria severa nei confronti di irritanti microbici provenienti dalla polpa necrotica (Figura 6). In relazione alla gravità dell'infezione, i pazienti possono riferire un discomfort da moderato a severo, gonfiore e manifestazioni sistemiche come febbre, malessere e leucocitosi.

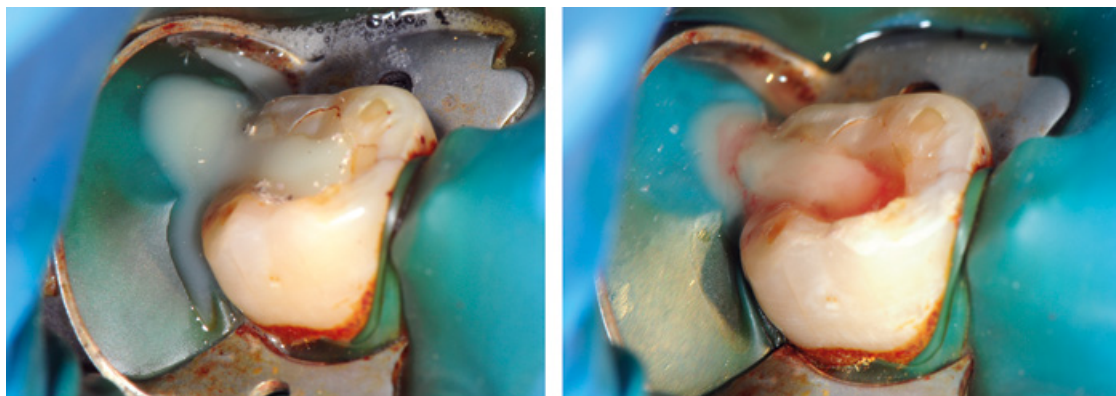


Figura 6 - Drenaggio transcamerale di elemento 46 affetto da infezione endodontica acuta.

I vari test di vitalità danno esito negativo mentre si riscontra una dolorabilità alla palpazione e percussione. A seconda del grado di distruzione dei tessuti duri, le caratteristiche radiografiche dell'ascesso apicale acuto vanno dall'allargamento dello spazio parodontale fino ad ampie aree di riassorbimento periradicolare. Microscopicamente si osserva una necrosi colliquativa, con massiccia presenza polimorfonucleati, detriti e un accumulo di essudato purulento. Perifericamente si può osservare tessuto di granulazione, in particolare se l'infezione persiste da un tempo prolungato. Se l'ascesso non comunica direttamente con il forame apicale, non si osserva drenaggio dopo aver aperto la camera pulpare. Oltre all'eliminazione dei contaminanti dal sistema canalare, la terapia medica è indicata in presenza di sintomi sistemici (15).

Ascesso apicale cronico

L'ascesso apicale cronico, anche classificato come parodontite apicale suppurativa, deriva da una lesione di lunga durata che ha creato un ascesso drenante verso una superficie (Figura 7). L'eziologia di questa forma è la stessa della sua variante acuta. L'essudato infiammatorio determina la formazione di un tragitto che, attraverso l'osso alveolare, raggiunge la mucosa orale o, talvolta, la cute. Grazie alla presenza del drenaggio, l'ascesso apicale acuto è di solito asintomatico, a eccezione di quando si verificano occlusioni accidentali del tragitto fistoloso che causano dolore. Le caratteristiche cliniche, radiografiche e istopatologiche sono simili a quelle della parodontite apicale cronica. Microscopicamente la fistola appare rivestita, completamente o parzialmente, da epitelio circondato

da tessuto connettivo infiammato.

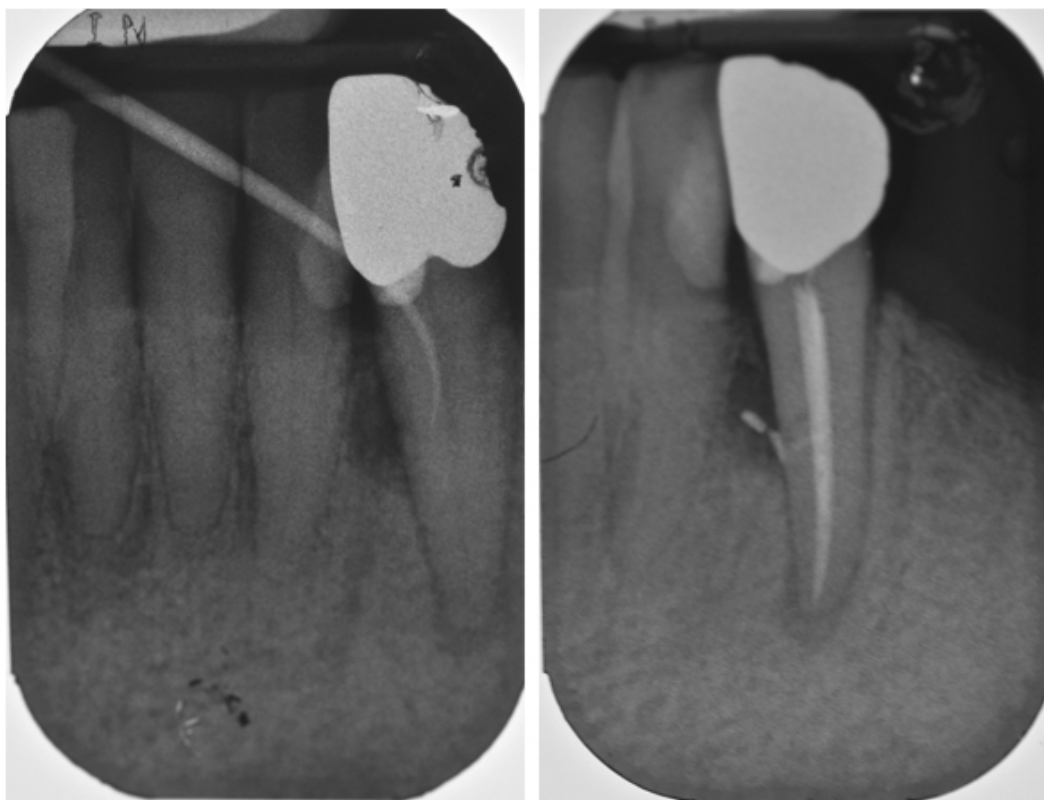


Figura 7 –Fistulografia di 33 con lesione periradicolare sostenuta da un canale laterale.

Microbiologia endodontica

Subito dopo la nascita, i mammiferi sono rapidamente colonizzati da un microbiota caratteristico per ciascuna specie. Si è stimato che la cavità orale ospiti circa 10^{10} batteri, appartenenti a oltre 700 differenti specie, ognuna con specifiche esigenze nutrizionali e in grado di stabilirsi in specifiche nicchie. Molte patologie infettive del cavo orale, quali la carie e le malattie parodontali, insorgono dunque in siti costantemente esposti a un ambiente contaminato. Tali patologie si sviluppano a livello di superfici sulle quali normalmente risiede un biofilm microbico; una modifica delle condizioni ambientali, del tipo di flora microbica o dell'efficienza della risposta immune dell'ospite favorisce l'avvento o la progressione della patologia. Tra le patologie dentali, l'infezione del canale radicolare ha caratteristiche di unicità poiché avviene in una sede dove i microrganismi normalmente non risiedono. Finché smalto e cemento sono intatti, polpa e canale radicolare rimangono protetti dall'invasione, ma una compromissione dell'integrità di tali strutture a causa di carie, fratture o traumi

può aprire una via per la penetrazione batterica attraverso i tubuli dentinali.

Affinché i microrganismi possano stabilizzarsi nel sistema dei canali radicolari e contribuire alla patogenesi della patologia periradicolare, sono necessari i seguenti requisiti (8):

- il microrganismo deve essere presente in un numero sufficiente di cellule per generare l'infezione e mantenerla;
- il microrganismo deve possedere dei fattori di virulenza che possano essere espressi durante l'infezione del canale radicolare;
- il microrganismo deve essere localizzato all'interno del sistema radicolare in modo che esso stesso o i suoi fattori di virulenza possano ottenere l'accesso al tessuto periradicolare;
- l'ambiente del canale radicolare deve permettere la sopravvivenza e la crescita del microrganismo e fornire stimoli per l'espressione dei fattori di virulenza;
- i microrganismi inibitori devono essere assenti o presenti in basse quantità nei canali radicolari;
- l'ospite deve mettere in atto una strategia di difesa a livello del tessuto periradicolare, inibendo il diffondersi dell'infezione. Questo processo porta alla distruzione tissutale.

Tutti i batteri del cavo orale hanno le medesime opportunità per invadere il canale radicolare, tuttavia solo un ristretto gruppo di specie è stato identificato nei canali infetti (16). La causa di questo rapporto sproporzionato tra invasori potenziali e reali è l'unicità dell'habitat costituito dal canale radicolare, all'interno del quale il tipo di infezione e il suo decorso sono regolati da una selezione biologica. L'ambiente anaerobio, le interazioni e la competizione tra microrganismi e la disponibilità di nutrienti sono i principali fattori che definiscono la composizione della flora microbica all'interno del canale. La tensione dell'ossigeno e i suoi derivati giocano un ruolo importante come determinanti ecologici. Il consumo di ossigeno e la produzione di anidride carbonica e idrogeno, insieme alla progressiva diminuzione del potenziale ossidoriduttivo, a causa dei microrganismi che per primi hanno invaso il canale, favoriscono la crescita selettiva di batteri anaerobi (13). Il tipo e la disponibilità di nutrienti sono importanti per determinare la crescita batterica. I nutrienti possono derivare dal cavo orale, dal

tessuto connettivo in fase degenerativa, dal contenuto dei tubuli dentinali o dal fluido proveniente dai tessuti periapicali.

Delle circa 500 specie riscontrate nei diversi tipi di infezione endodontica, il 45% è stato riscontrato solo mediante studi molecolari, il 32% solo da studi colturali mentre il restante 33% mediante entrambi gli approcci (17). Negli ultimi anni si è osservato un spostamento dal concetto del “singolo patogeno” verso l’ipotesi di “comunità” associata alle diverse forme di infezione endodontica. Secondo questa ipotesi la comunità microbica rappresenta l’unità patogena e molti fattori influenzano la sua virulenza, in particolare la presenza di alcune specie, la loro interazione all’interno della comunità e l’accumulo di fattori di virulenza. È emerso che profili caratteristici della comunità microbica tendono a ripresentarsi nelle diverse forme di patologia endodontica. In base ai risultati degli studi del microbioma endodontico è emerso che (18):

- le differenti infezioni endodontiche sono sostenute da comunità multispecie;
- vi è una grande variabilità interindividuale delle comunità batteriche associate alla stessa patologia clinica e diverse combinazioni di specie microbiche possono determinare la stessa malattia;
- nonostante l’alta eterogeneità interindividuale, alcuni pattern sono più frequenti in particolari forme cliniche. Per esempio le comunità batteriche associate a lesioni sintomatiche sono più simili tra di loro rispetto le comunità riscontrate in denti con lesioni asintomatiche.
- sono emerse differenze geografiche con minore variabilità interindividuale fra individui residenti nella stessa area geografica rispetto individui proveniente da aree lontane.

Esistono differenti tipologie di infezioni endodontiche, che sono solitamente associate a differenti condizioni cliniche (Figura 8). L’infezione primaria è causata da microrganismi che colonizzano il sistema canalare e che provengono dalla cavità orale. Il microbiota coinvolto generalmente si modifica nel tempo, in funzione delle diverse condizioni ambientali. L’infezione secondaria, o persistente, è la causa dei fallimenti in elementi già trattati endodonticamente, ed è legata alla persistenza di microrganismi sopravvissuti alle procedure di disinfezione o che sono penetrati nel

sistema canalare durante o dopo il trattamento endodontico

Le conoscenze dei microrganismi implicati nelle diverse forme infezioni endodontiche sono cambiate in modo significativo con i progressi delle tecniche colturali e molecolari. Originariamente si riteneva che i batteri Gram-positivi fossero i principali componenti della flora microbica in denti infetti (19). Il miglioramento delle tecniche di campionamento con il controllo delle contaminazioni accidentali e lo sviluppo di tecniche per la crescita in anaerobiosi ha permesso di identificare numerosi batteri anaerobi nel contesto di infezioni endodontiche (20).

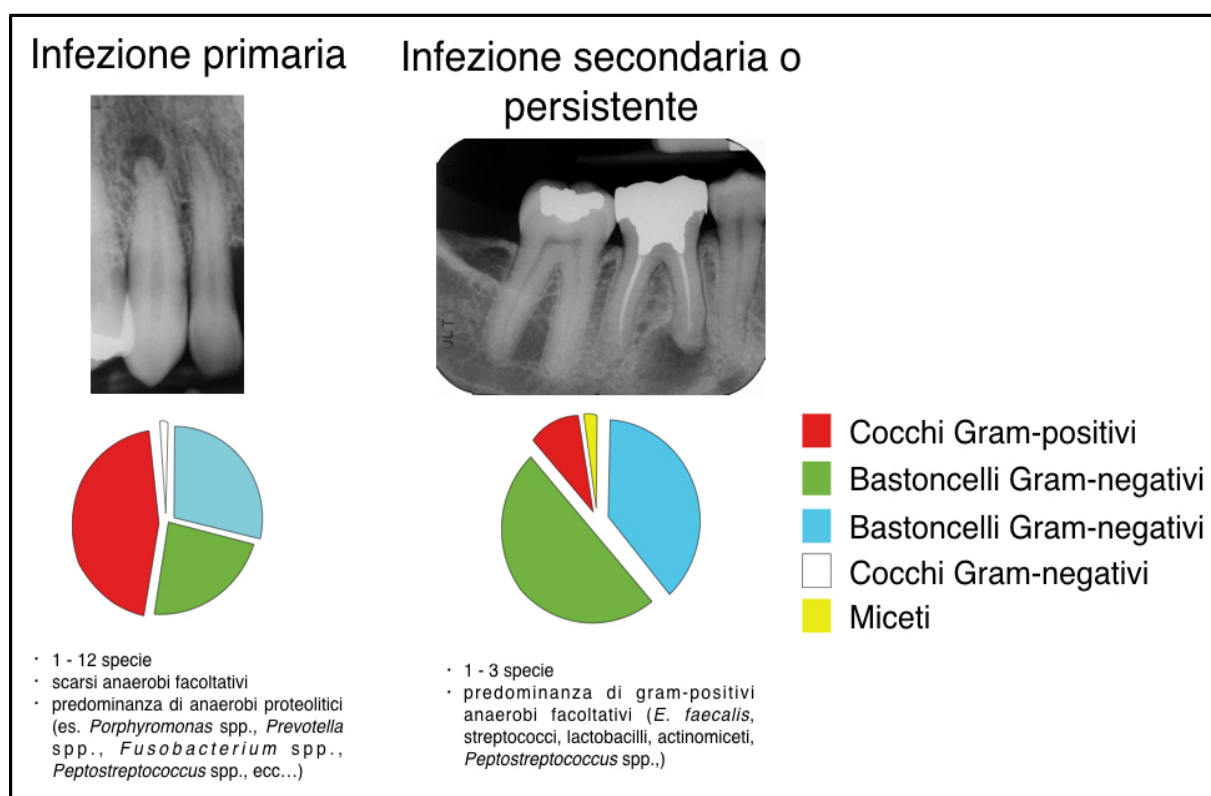


Figura 8 - Differenze microbiologiche fra infezioni primarie e secondarie/persistenti. Modificata da Fouad AF. Endodontic microbiology. Ames, Iowa, US: Wiley-Blackwell; 2009 (21).

Attualmente si ritiene che le infezioni endodontiche primarie siano polimicrobiche e dominate da anaerobi obbligati, con proporzioni simile fra Gram-positivi e Gram-negativi (22). Le attuali tecniche colturali hanno riscontrato frequentemente specie appartenenti ai generi *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Porphyromonas* (23). Tecniche molecolari come la polymerase chain reaction (PCR), nested PCR, checkerboard hybridization assays e denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

hanno ulteriormente espanso il numero delle specie microbiche riscontrate all'interno dei canali infetti. Le specie non precedentemente individuate mediante le tecniche colturali ed evidenziate con le indagini molecolari includono *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, e *Prevotella tannerae* (17). Inoltre specie come *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* sono state riscontrate con frequenze superiori rispetto ai precedenti studi colturali (24). Le infezioni secondarie o persistenti hanno un profilo microbico differente dalle infezioni primarie. La persistenza dell'infezione endodontica è spesso correlata alle difficoltà nell'eliminare efficacemente le specie microbiche presenti al momento del trattamento iniziale. Un insufficiente controllo della sterilità, un'imprecisa preparazione della cavità di accesso, la mancata identificazione di tutti i canali, un'inadeguata strumentazione e restauri temporanei o permanenti incongrui sono tutti esempi di difetti procedurali che possono causare la persistenza della patologia endodontica (25). Studi colturali hanno evidenziato che le infezioni secondarie, rispetto le primarie, coinvolgono un numero minore di specie e queste sono dominate da anaerobi facoltativi Gram-positivi. I generi frequentemente riscontrati in infezioni secondarie includono *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces* e *Candida* (26-28).

Vi è differenza tra le specie riscontrate nelle infezioni secondarie in denti con trattamento endodontico inadeguato e quelle in denti trattati in modo congruo. Nei primi, la flora microbica è simile a quella delle infezioni polimicrobiche tipiche dei canali non trattati (25). Se si considerano le cause più frequenti di fallimento endodontico in denti trattati in modo incongruo (asepsi inadeguata, restauro coronale mal eseguito, rimozione incompleta del contenuto canalare, inefficace disinfezione) si può dedurre che le condizioni intracanalari di questi elementi non siano molto differenti da quelle di denti con infezioni primarie. I batteri riscontrati in infezioni secondarie in denti ben trattati devono essere in grado di sopravvivere in condizioni ostili, in quanto la corretta preparazione chemo-meccanica e l'otturazione tridimensionale riducono sensibilmente la disponibilità di nutrienti. La fonte principale di nutrimento è stata individuata nell'essudato proveniente dal tessuto periapicale.

Il riscontro clinico della sopravvivenza di alcune specie batteriche ad una corretta strumentazione e

all'irrigazione canalare contrasta con numerose evidenze che riportano l'efficacia battericida dei comuni irriganti, in particolare ipoclorito di sodio, nei confronti dei patogeni endodontici. La spiegazione più plausibile è che tali specie, penetrate all'interno di ramificazioni secondarie o nei tubuli dentinali, risultino protetti dagli irriganti e dalle medicazioni intermedie (12).

Sebbene molti batteri del canale radicolare siano sensibili all'elevato pH dell'idrossido di calcio, diverse specie tipiche dell'infezione persistente hanno la capacità di resistere all'aumento del pH (29).

È noto infatti che il potere tampone della dentina è in grado di ridurre sensibilmente il pH alcalino indotto dall'idrossido di calcio sino a valori compatibili con la crescita di alcune specie di patogeni endodontici.

Biofilm batterici

Originariamente, i microrganismi sono stati considerati solo nella loro forma planctonica, cioè cellule fluttuanti in un supporto liquido. Tuttavia, frequentemente, i batteri si strutturano in biofilm con un fenotipo, una trascrizione genica e un tasso di crescita diverso dai microrganismi in forma planctonica. Un biofilm è un aggregato di cellule microbiche, associate a una superficie e incluse in una matrice polimerica extracellulare da esse prodotta e si compone per circa il 15% di cellule e per il restante 85% di matrice extracellulare (30). I biofilm sviluppano specifici meccanismi per l'adesione iniziale alla superficie, per la crescita di comunità strutturate, formando piccoli ecosistemi in grado, inoltre, di separarsi in minute porzioni per colonizzare aree a distanza (Figura 9). Diversi studi effettuati in ecosistemi diversi hanno riportato che la maggior parte della biomassa batterica presente in natura cresce sotto forma di biofilm organizzati in comunità molto elaborate (31). I biofilm possono essere costituiti da una singola specie, ma più frequentemente sono presenti varie specie microbiche.

I batteri organizzati in biofilm multicellulari rappresentano una sfida clinica, dal momento che essi sono responsabili di più del 65% di tutte le infezioni batteriche nell'uomo, comprese le infezioni orali (31). La placca dentale è uno dei sistemi di biofilm più complessi presenti in natura e le patologie

endodontiche, al pari della carie e della malattia parodontale, sono considerate malattie da biofilm. Il primo autore a dimostrare la presenza di biofilm all'interno di canali infetti fu Nair nel 1987 mediante indagini al microscopio elettronico a scansione (32). Lo step iniziale nella formazione dei biofilm è l'adesione, da parte di batteri pionieri, al substrato mediante alcune strutture presenti sulla membrana batterica. Dopo l'adesione dei batteri pionieri, il biofilm comincia a maturare. Inizialmente si forma un monostrato di cellule adese le quali iniziano a produrre la matrice extracellulare che determinerà all'architettura del biofilm. La matrice è formata da un agglomerato di differenti tipologie di polimeri, conosciuti come sostanza polimerica extracellulare, e da essa dipende l'impalcatura del biofilm, l'adesione alla superficie e la sua coesione interna (33). Nei batteri Gram-negativi, la comunicazione cellulare all'interno del biofilm avviene attraverso degli autoinduttori, piccole molecole segnale diffusibili rilasciate dalle cellule.

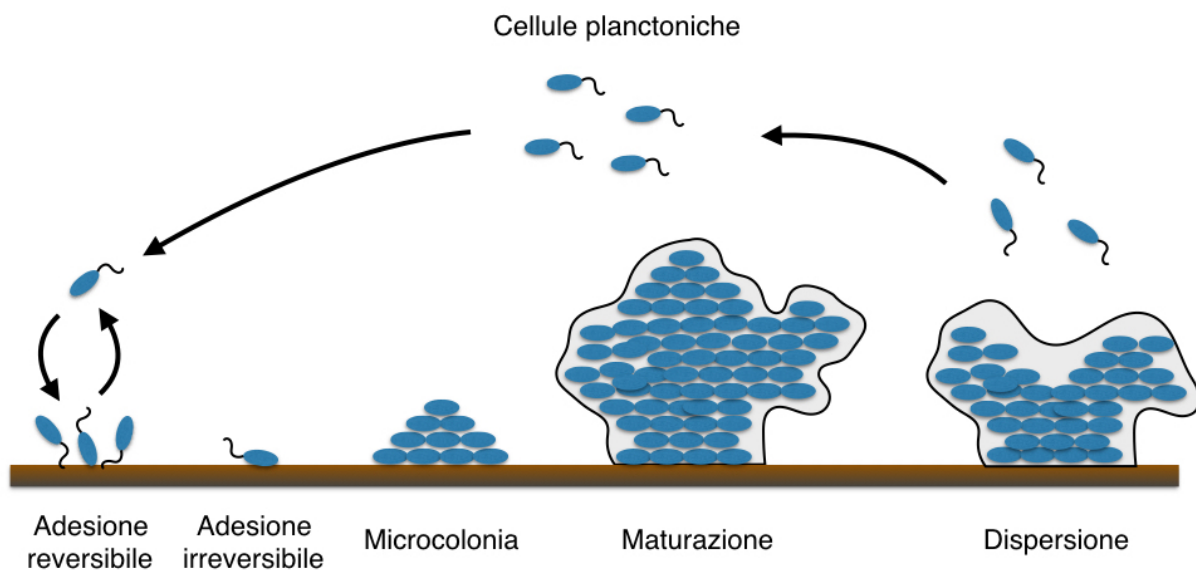


Figura 9 - Processo di formazione del biofilm.

A una densità di popolazione soglia, definita *quorum*, gli autoinduttori accumulati possono interagire con i recettori situati sulla superficie della cellula batterica che controllano l'espressione genica. In questo modo, la densità di popolazione è in grado di modulare e guidare l'espressione coordinata di gruppi di geni. Questo meccanismo è definito *quorum sensing* ed è coinvolto nella regolazione di

varie proprietà microbiche, quali la virulenza, la capacità di formare biofilm, di incorporare DNA extracellulare, di adattarsi agli stress ambientali e la resistenza agli agenti antimicrobici. Anche i biofilm che causano le infezioni endodontiche utilizzano il quorum sensing come meccanismo di regolazione interno. Le caratteristiche strutturali dei biofilm incidono sull'instaurarsi di infezioni batteriche croniche, come sulla superficie dentale o su quella canalare, e la tendenza delle microcolonie a distaccarsi dal biofilm può produrre infezioni a distanza propagando la colonizzazione batterica.

Data la complessità e l'organizzazione eterogenea della comunità microbica, i biofilm sono refrattari alla terapia. Infatti, la natura della struttura del biofilm e le caratteristiche fisiologiche dei microrganismi che lo popolano conferiscono una resistenza agli agenti antimicrobici come antibiotici, disinfettanti e detergenti, assai superiore a quella delle stesse specie in forma planctonica. La resistenza antimicrobica del biofilm è dovuta a strategie multicellulari e alla capacità delle singole cellule di esprimere un fenotipo in grado di tollerare l'azione antibiotica. I meccanismi responsabili della resistenza possono essere diversi, tra questi vi è la diffusione ritardata dell'agente antimicrobico attraverso la matrice del biofilm, il tasso di accrescimento alterato degli organismi all'interno del biofilm e i cambiamenti fisiologici dovuti al processo di sviluppo del biofilm. I meccanismi patogenetici causati dal biofilm includono il distacco di aggregati batterici dallo stesso biofilm con diffusione in altri distretti, la produzione di endotossine e la resistenza al sistema immunitario, anche attraverso plasmidi derivanti da processi di coniugazioni. Le cellule batteriche sessili rilasciano antigeni e stimolano la risposta immunitaria e quindi la produzione di anticorpi, ma questi, spesso, non sono efficaci nell'uccidere i batteri all'interno del biofilm. La terapia antibiotica convenzionale tipicamente risolve i sintomi causati dalle cellule planctoniche rilasciate dal biofilm, ma non riesce a eradicare efficacemente il biofilm. Per questa ragione, queste infezioni tipicamente mostrano sintomi ricorrenti, anche dopo cicli di terapia antibiotica, finché la popolazione sessile non è meccanicamente o chimicamente rimossa dall'organismo. Per la rimozione dei batteri patogeni e del biofilm da loro formato, diverse soluzioni irriganti e diverse tecniche sono utilizzate durante le procedure

endodontiche (34). I biofilm all'interno del sistema canalare di denti necrotici sono del tutto isolati dalle difese immunitarie e non suscettibili all'azione degli antibiotici in quanto la microcircolazione pulpare è essente. Possono quindi rappresentare focolai di infezioni acute quando le difese dell'ospite non riescono ad eliminare le cellule planctoniche rilasciate dal canale nei tessuti periapicali.

Enterococcus faecalis

Il genere *Enterococcus* è formato da cocchi Gram-positivi anaerobi facoltativi che fino al 1984 erano classificati come Streptococchi del gruppo D. Gli enterococchi sono frequentemente presenti nell'ambiente, appaiono positivi alla colorazione di Gram e di forma ovoidale (Figura 10), generalmente sono disposti a coppie o in corte catenelle (Figura 11).

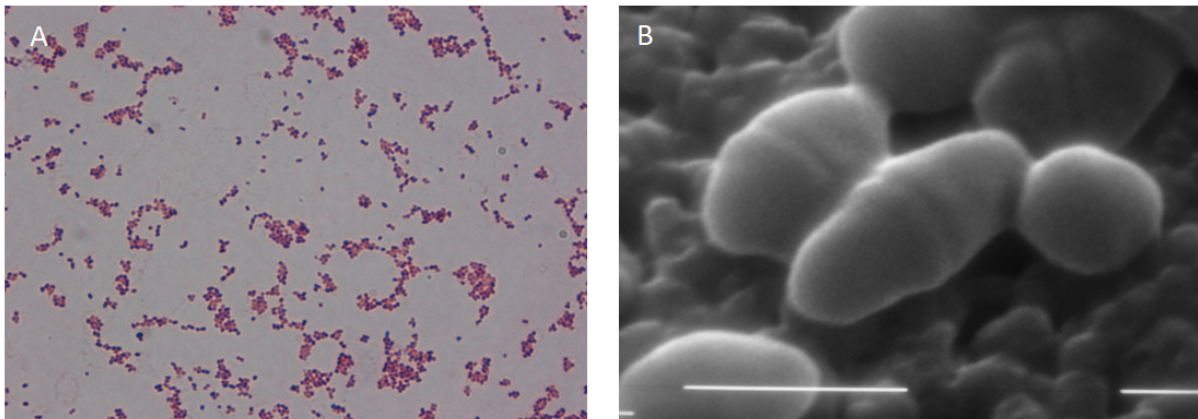


Figura 10 - A) *E. faecalis* visualizzato in microscopia ottica dopo colorazione di Gram (ingrandimento 100X). B) *E. faecalis* visualizzato al SEM (barra = 1 μm).

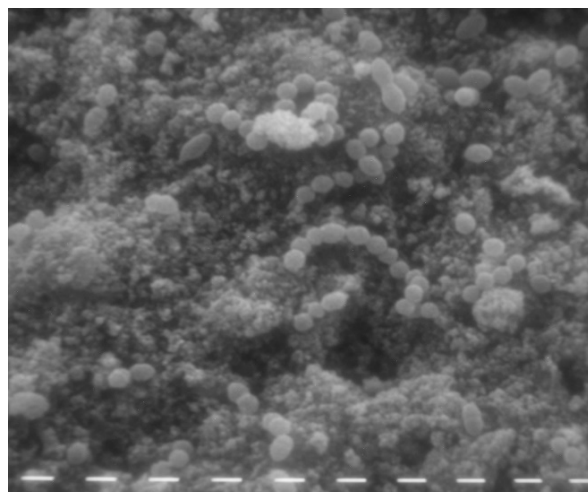


Figura 11 - Immagine al microscopio elettronico a scansione della tipica disposizione a catenelle di *E. faecalis* (barra = 1 μm).

E. faecalis e *E. faecium* sono le 2 specie di enterococco più frequentemente riscontrate nell'uomo. *E. faecalis* fa parte della normale flora commensale del tratto gastrointestinale e del tratto genitale femminile. Nel cavo orale è presente in minore quantità (35). Dopo gli stafilococchi coagulasi-negativi, *E. faecalis* è il più comune patogeno nosocomiale ematico ed è responsabile, inoltre, di infezioni urinarie e pelvico-addominali, di endocarditi infettive e di infezioni di protesi articolari (36). L'antibiotico resistenza di *E. faecalis* è una delle cause principali dell'alta prevalenza nelle infezioni nosocomiali. *E. faecalis* mostra una resistenza intrinseca a molti antibiotici, tra cui i beta-lattamici, molti aminoglicosidi e la clindamicina. Inoltre è in grado di acquisire multipli tratti di resistenza mediante trasmissione di plasmidi. Risulta particolarmente resistente essendo in grado di moltiplicarsi a un pH alcalino di circa 10, a temperature comprese fra 10°C e 45°C, in soluzioni iperosmolari al 6,5% NaCl e di sopravvivere se incubato a 60°C per 30 minuti (12)

E. faecalis è presente nelle infezioni endodontiche primarie in una percentuale che varia dal 4 al 40%, e, in queste infezioni, è associato maggiormente a lesioni periradicolari croniche asintomatiche rispetto a parodontiti periradicolari acute o ascessi (35). La sua frequenza nelle infezioni periradicolari persistenti è molto più elevata. Infatti, nelle infezioni secondarie *E. faecalis* è presente fino a nove volte di più rispetto alle infezioni endodontiche primarie (35).

E. faecalis è in grado di organizzarsi in biofilm e questa proprietà ne aumenta fino a 1000 volte la resistenza all'eradicazione mediante le normali procedure chemo-meccaniche di disinfezione (37). Questa specie, se esposta a condizioni ambientali sfavorevoli, come uno stato nutrizionale limitato, entra in uno stato quiescenza in cui le cellule risultano particolarmente resistenti a irradiazioni UV, calore, ipoclorito di sodio, perossido di idrogeno, etanolo e acidi. In questo stato di quiescenza le cellule sono in grado di resistere fino a 12 mesi all'interno dei tubuli dentinali, anche dopo l'otturazione sistema radicolare (38).

La sua sopravvivenza è legata ad altre proprietà, fra le quali la parziale resistenza alle medicazioni intracanalari con idrossido di calcio per la presenza di un'efficace pompa protonica in grado di mantenere il pH citoplasmatico a livelli ottimali (39).

E. faecalis possiede molti fattori di virulenza tra i quali adesine di superficie, sostanze aggreganti, acido lipoteicoico, superossidi extracellulari, ferormoni, enzimi litici come serina-proteasi, gelatinasi, citolisina e ialuronidasi (39). La sua capacità di legarsi specificamente a proteine della matrice extracellulare, incluso il collagene di tipo I mediante espressione di adesine di superficie, è di particolare importanza nelle infezioni endodontiche, essendo il collagene I il costituente principale della dentina (40). Questa capacità permette a *E. faecalis* di iniziare la colonizzazione della superficie dentinale anche in assenza di altri microrganismi.

Gli enzimi litici espressi da *E. faecalis* gli conferiscono la capacità di sfruttare il collagene contenuto all'interno della dentina come substrato energetico permettendo la crescita anche in assenza di fonti di nutrimento provenienti dal cavo orale o dal siero proveniente dall'area periapicale (35).

Candida spp.

Le specie appartenenti al genere *Candida* possono causare un'ampia varietà di infezioni nell'uomo, spaziando da patologie superficiali fino a micosi disseminate particolarmente gravi. Diverse specie di *Candida* sono presenti a livello di diversi distretti (cavità orale, genitali, tratto gastrointestinale) in soggetti sani (41). La prevalenza di *C. albicans* nella cavità orale è stata riportata tra il 30% e l'80% negli adulti sani (42) mentre è del 95% nei pazienti affetti dal virus dell'immunodeficienza umana (HIV) (43). Si ritiene che il dorso della lingua sia l'habitat orale principale di *C. albicans*, mentre altri siti possono essere colonizzati secondariamente (42). Tra questi siti ritroviamo la mucosa e la zona sopragengivale, la dentina, la radice, la zona sottogengivale e le tasche parodontali. Oltre *C. albicans*, altre specie sono state isolate dalla cavità orale, come *C. glabrata*, *C. guilliermondi*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. inconspicua*, *C. dublinensis* e *C. tropicalis* (44). Alcuni studi che hanno mostrato la presenza di specie fungine nelle infezioni endodontiche, hanno generato un nuovo interesse per il ruolo di questi microrganismi nell'eziologia delle patologie periradicolari (45).

Diversi studi hanno riportato la presenza di *Candida spp.* in circa il 5-17% dei casi di periodontite apicale (46). Questi miceti non risultano essere comuni membri del microbiota associato alle infezioni

primarie, ma sono stati rilevati più comunemente nei canali radicolari trattati endodonticamente e associati a fallimento endodontico (45). Ciò supporta l'ipotesi che questi miceti penetrino all'interno dei canali radicolari per contaminazione durante la terapia endodontica e possano essere i responsabili delle lesioni radicolari persistenti.

I meccanismi che si crede possano regolare la patogenicità in *Candida* sono: 1) adattabilità a diverse condizioni ambientali, 2) adesione a diverse superfici, 3) produzione di enzimi idrolitici, 4) cambiamenti morfologici, 5) formazione di biofilm e 6) immunomimetismo ed immunomodulazione delle difese dell'ospite.

Per quanto riguarda le capacità di adattamento all'ambiente, *C. albicans* è un organismo versatile, con la capacità di sopravvivere come commensale in diversi siti corporei anatomicamente distinti con caratteristiche ambientali diverse. Ad esempio *C. albicans* riesce a sopravvivere sia al pH neutro del torrente circolatorio che al pH acido del canale vaginale (47). Tale adattabilità è da attribuirsi al cambiamento che avviene nell'espressione genica in conseguenza ai mutamenti ambientali.

L'adesione a diverse superfici è legata invece alla presenza di molecole di adesione superficiali che mediano il legame ai tessuti dell'ospite; tra queste si riconoscono integrine che legano fibrinogeno, fibronectina, laminina e vitronectina; lectine che legano gli zuccheri presenti sulle cellule epiteliali e proteine contenenti mannosio che si legano alle molecole simili dell'ospite, tra le quali si ritrova anche il collagene di tipo I e IV (48).

Alcune specie di *Candida* hanno mostrato di potersi aggregare con alcuni batteri orali; ad esempio *C. dublinensis* si lega a *F. nucleatum* e *C. tropicalis* si lega a *S. gordonii* (49, 50). Queste interazioni possono permettere una sopravvivenza migliore all'interno di comunità microbiche miste e favorire la colonizzazione della mucosa orale e dei tessuti duri.

C. albicans ha la capacità di produrre enzimi idrolitici che possono intervenire nella genesi del danno ai tessuti periradicolari. Tra gli enzimi secreti si riconoscono proteasi come collagenasi, aminopeptidasi, glucosaminidasi, fosfatasi alcalina ed acida, ialuronidasi e condroitin-solfatasi, tutti enzimi che partecipano alla degradazione delle proteine della matrice extracellulare (21). È stato

dimostrato che gli enzimi collagenolitici prodotti da questi miceti possono degradare il collagene della dentina umana (51). Le fosfolipasi idrolizzano i fosfolipidi delle membrane citoplasmatiche e determinano una lisi cellulare; la maggior parte dell'attività fosfolipasica si esplica in prossimità dell'apice radicolare durante l'invasione tissutale (21).

Un altro fattore di virulenza di *Candida* è la sua capacità di mutare morfologia. *C.albicans* è un micete dimorfico che esiste sia in forma di blastospore che in forma di ifa. Tuttavia, alcuni autori preferiscono considerarlo un micete polimorfico per la sua capacità di sopravvivere in diverse forme (blastospore, tubi germinali, ife vere, pseudoife e clamidiospore) in relazione dalle condizioni ambientali presenti (21). Si è ritenuto che la transizione da blastospore alla forma ifale rappresentasse un cambiamento fondamentale per il passaggio del fungo dallo stato di commensale a quello di patogeno, tuttavia questo concetto non viene più considerato corretto (52). Le proprietà di un'ifa in crescita possono far acquisire al microrganismo la capacità di invadere i tessuti e di evitare la fagocitosi da parte dei macrofagi. La maggior parte delle infezioni da *C. albicans* sono causate sia da lieviti che da forme filamentose del fungo, suggerendo che entrambi gli aspetti svolgano un ruolo importante nello sviluppo e progressione della patologia. Tale assunto è supportato dal fatto che le cellule fungine in forma di lieviti possiedono diverse proteine atte al riconoscimento della cellula ospite e possono rappresentare la forma colonizzatrice iniziale (53).

Importante per la maggiore patogenicità di *C. albicans* rispetto ad altre specie fungine è la sua capacità di formare biofilm su differenti superfici, a differenza di specie che non possiedono tale abilità quali ad esempio *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Le cellule di *C. albicans* all'interno di un biofilm possono essere 100 volte più resistenti rispetto ad agenti antifungini quali il fluconazolo e 20-30 volte più resistenti all'amfotericina B, rispetto a cellule nello stato planctonico (54).

C. albicans ha importanti capacità di immunomimetismo ed immunomodulazione, specialmente nei confronti dei neutrofili; questa specie ha dimostrato di poter bloccare le funzioni dei neutrofili, come la liberazione di radicali liberi dell'ossigeno e i fenomeni di degranulazione, esplicando inoltre

un'azione litica diretta nei confronti dei monociti (55). La sua attività immunomodulante deriva inoltre dalla capacità di produrre proteasi in grado di degradare i fattori del complemento e le immunoglobuline IgG1, IgA1 e IgA2 (56). I costituenti della parete cellulare (come glucani, chitina, e mannoproteine) hanno effetto immunomodulante che può essere sia attivatore che inibitore, generando reazioni che possono intervenire nella patogenesi delle lesioni periradicolarie attraverso meccanismi indiretti. Un esempio è fornito dallo stimolo che *C. albicans* genera per la sintesi di citochine proinfiammatorie e per il reclutamento di macrofagi, cellule endoteliali e fibroblasti (57). Importante è anche la possibilità da parte di questi miceti di attivare i fattori del complemento, che, in risposta al loro clivaggio, danno origine ad una serie di risposte biologiche con un effetto proinfiammatorio (aumento permeabilità vascolare, attività chemotattica e di opsonizzazione che favoriscono la fagocitosi).

La colonizzazione della dentina rappresenta un passaggio importante nel processo di infezione del sistema canalare radicolare, ed assume una particolare rilevanza per quanto riguarda la competizione che si viene ad instaurare per la nicchia ecologica ed i nutrienti tra i diversi membri della comunità microbica endodontica. L'invasione dei tubuli dentinali può proteggere le cellule microbiche dall'effetto delle procedure intracanalari, risultando importante nell'instaurazione di un processo patologico persistente a carico dei canali radicolari. I lieviti hanno in media un diametro da 1 a 6 μm , mentre le ife vanno da 1,9 a 2,6 μm (21). Sulla base di tali dimensioni cellulari, si può supporre che i funghi abbiano la capacità di penetrare all'interno dei tubuli dentinali. Tale teoria è supportata da diversi studi; Sen et al. investigarono le modalità di crescita di *C. albicans* in rapporto alla dentina radicolare umana ed osservarono blastospore e strutture ifali sulle pareti canalari di tutti i campioni analizzati (58). La maggior parte di queste strutture, ed in particolare le pseudoife, mostrano di poter penetrare all'interno dei tubuli dentinali. È stato supposto che il tigmotropismo posseduto dalle ife di *Candida* renda inevitabile l'invasione della dentina; di conseguenza sulla base delle caratteristiche di invasività ed affinità nei confronti della dentina *C.albicans* viene considerata un microrganismo dentinofilo (21).

Peptidi antimicrobici

I peptidi antimicrobici (antimicrobial peptides, AMP) sono molecole endogene prodotte da organismi multicellulari come meccanismo di difesa nei confronti di microrganismi patogeni. Si tratta di corte sequenze amminoacidiche presenti in natura con capacità anti-infettive, immunomodulanti e anti-infiammatorie (59). Rappresentano molecole di difesa fisiologicamente molto antiche e sono virtualmente espresse da ogni regno e *phyla*, inclusi batteri, funghi, animali e piante. I numerosi AMP attualmente conosciuti e le loro varianti sintetiche sono molto eterogenei in lunghezza, sequenza e struttura, ma la maggior parte sono piccoli (generalmente 15-50 aminoacidi), cationici, anfifilici, hanno una carica netta positiva e contengono più del 30% di aminoacidi idrofobici (60).

Gli AMP possiedono diverse capacità, tra cui quella di esplicare l'attività anti-infettiva, anti-virale e anti-infiammatoria, poiché sono in grado di favorire la fagocitosi e il reclutamento di differenti cellule immunitarie nei siti infiammatori. Sono in grado di inibire la formazione del biofilm e di indurre la dissoluzione del biofilm già esistente (61, 62). Inducono la riparazione delle ferite e l'angiogenesi (63-66). Possono essere considerati come degli agenti antitumorali dal momento che le cellule tumorali, a causa di un elevato contenuto di fosfatidilserina sulla membrana, sono molto suscettibili agli AMP (67, 68).

Alcuni AMP sono stati recentemente identificati come una potenziale alternativa ai tradizionali agenti disinfettanti utilizzati contro i biofilm, grazie alla loro abilità di prevenirne la formazione e di dissolvere il biofilm esistente, sia esso formato da patogeni Gram-negativi che Gram-positivi (69-74). Sono inoltre caratterizzati da una tossicità molto bassa per le cellule dell'ospite e da una scarsa tendenza a indurre resistenze (75).

Caratteristiche strutturali e meccanismo d'azione

Gli AMP sono eterogenei per struttura, sequenza e lunghezza; possiedono carica positiva grazie alla presenza di residui di lisina e arginina, sono cationici e anfipatici, caratteristiche che permettono loro di ripartirsi all'interno del doppio strato fosfolipidico delle membrane (76).

Questo consente ai peptidi di interagire con le membrane e di traslocare all'interno delle cellule batteriche, cariche negativamente, per esprimere il proprio meccanismo di attività microbica diretta su microrganismi planctonici, oltre che attività anti-biofilm e proprietà immunomodulatorie (77).

L'azione dei peptidi si basa sulla loro interazione con le membrane cellulari, portando alla depolarizzazione e alla rottura delle stesse (78). Cruciale è l'attività microbica specifica nei confronti delle cellule procariote che consente di preservare dalla distruzione le cellule dell'ospite (79).

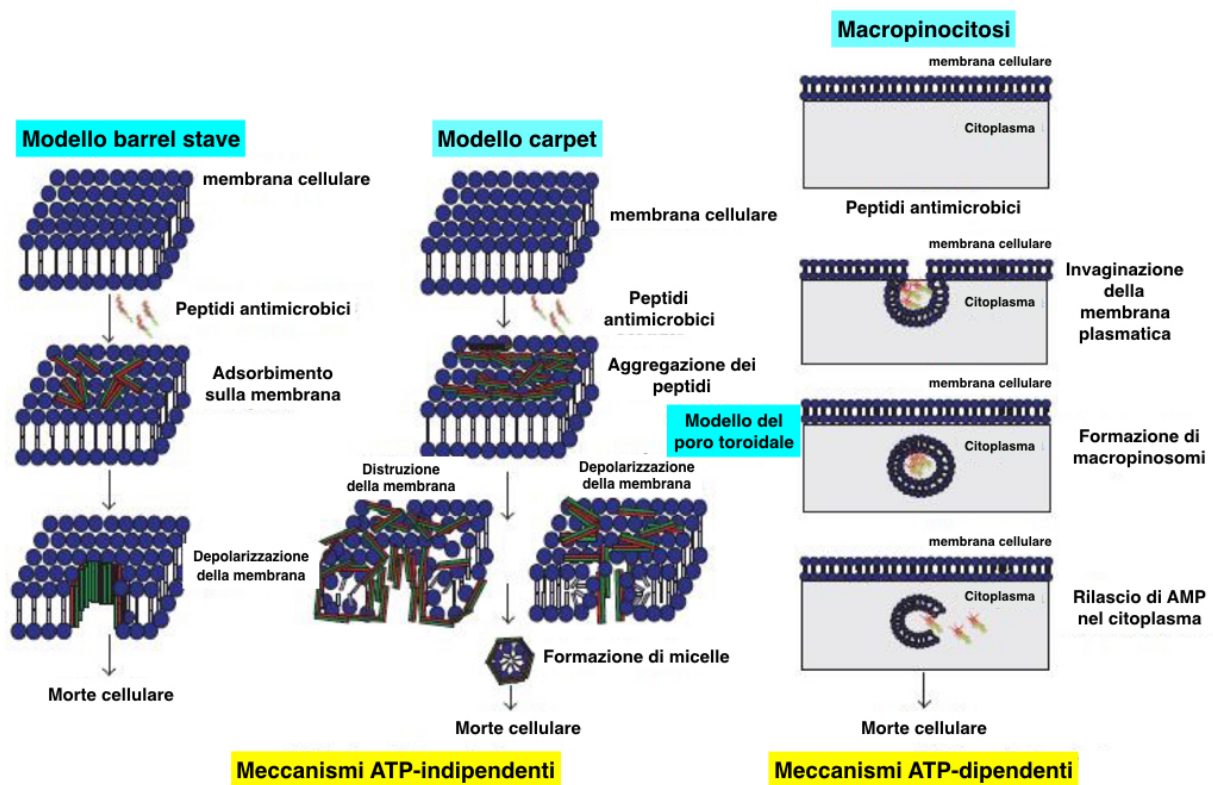


Figura 12 - Rappresentazione schematica del meccanismo d'azione degli AMP. Modificata da Pushpanathan et al. Antimicrobial peptides: versatile biological properties. Int J Pept, 2013. 2013: p. 6 (67).

Come illustrato in Figura 12, il contatto iniziale è garantito da interazioni elettrostatiche che si creano tra il peptide carico positivamente ed elementi carichi negativamente presenti sulle superfici batteriche, come LPS per i Gram-negativi e acidi lipoteicoici per i Gram-positivi. Le membrane cellulari dei mammiferi sono invece costituite da fosfolipidi zwitterionici, ossia elettricamente neutri nel loro complesso, e la presenza di colesterolo, la cui funzione è quella di stabilizzare il doppio strato fosfolipidico, neutralizza l'attività del peptide, rendendo così il legame alle cellule molto più labile

(80).

I peptidi antimicrobici devono necessariamente interagire con le membrane batteriche per mettere in atto la loro azione antibatterica, portando alla distruzione della membrana stessa e conseguentemente degli eventi che dipendono da essa. In genere, i peptidi antimicrobici carichi positivamente interagiscono con le teste idrofile dei lipidi carichi negativamente dello strato esterno della membrana citoplasmatica. Il peptide viene quindi inserito nella porzione esterna del doppio strato fosfolipidico della membrana citoplasmatica, portando al dislocamento dei lipidi. Infine, i peptidi possono traslocare attraverso la membrana e diffondere nel citoplasma fino a raggiungere i target cellulari (61).

La macropinosi prevede l'invaginazione della membrana plasmatica con conseguente formazione di vescicole, chiamate macropinosomi, che inglobano i peptidi che vengono poi rilasciati nel citoplasma (81).

Una volta all'interno della cellula, i peptidi possono agire su diversi bersagli, ad esempio inibendo enzimi essenziali per la sintesi della parete batterica, ma anche delle proteine. Essi possono inoltre indurre la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) o la degradazione della membrana mitocondriale, con efflusso di ATP e NADH (82). Alcuni inibiscono le proteasi batteriche (83). Recentemente sono state valutate le potenzialità terapeutiche di peptidi derivati da anticorpi, come possibili agenti farmacologici per la terapia di malattie infettive, in particolare sostenute da microrganismi multiresistenti ai farmaci, e di disordini immunologici (84, 85). Diversi studi hanno messo in evidenza l'attività antimicrobica, antivirale, immunomodulatoria e/o antitumorale *in vitro*, *ex vivo* e/o *in vivo*, di peptidi di derivazione anticorpale con meccanismi simili a quelli attuati dalle molecole dell'immunità innata (85-91).

Utilizzo di AMP in endodonzia

Gli studi sugli AMP e il loro utilizzo in ambito medico e farmacologico sono molto più diffusi che in ambito odontoiatrico. Tuttavia, gli studi disponibili indicano come questi composti siano efficaci nel

contrastare alcuni microrganismi endodontici, oltre che nella modulazione della risposta immuno-infiammatoria (62).

Negli ultimi anni è emerso un interesse crescente circa la possibile applicazione di AMP in ambito endodontico, come potenziale alternativa di nuova generazione alle terapie antimicrobiche tradizionali, che non sono in grado di eliminare i microrganismi resistenti e promuovere la riparazione tissutale (62).

In letteratura si ritrovano infatti diversi studi riguardanti l'utilizzo di differenti AMP in modelli *in vitro* di infezione endodontica.

Turner et al., nel 2004, hanno valutato l'azione della nisina nei confronti di *E. faecalis* e *Streptococcus gordonii* in soluzione e all'interno del canale radicolare. *E. faecalis* si è mostrato più resistente alla nisina rispetto *S. gordonii*. Il peptide ha mostrato un'attività paragonabile all'idrossido di calcio nel modello di infezione endodontica utilizzato (92).

Tao et al., nel 2011, hanno valutato l'azione del peptide pleurocidina sui alcuni ceppi di batteri presenti nel cavo orale, quali *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *S. gordonii* ed *E. faecalis*. I risultati hanno mostrato una grande varietà a seconda delle specie considerate, ed *E. faecalis* in particolare ha mostrato la più grande resistenza nei confronti del peptide (93).

Nel 2012, Lee et al. hanno valutato *in vitro* l'azione antibatterica della β -defensina umana 3 (HBD3) nei confronti del biofilm di *E. faecalis* cresciuto su blocchi dentina, paragonandola all'azione dell'idrossido di calcio e della clorexidina. HBD3 ha dimostrato un'inibizione della crescita di *E. faecalis* maggiore rispetto i trattamenti convenzionali (94).

Tong et al., nel 2013, hanno dimostrato che l'aggiunta di nisina a MTAD, un irrigante intracanalare contenente doxiciclina, ne aumentava le capacità inibenti nei confronti di 10 isolati clinici di *E. faecalis* (95).

L'anno successivo, lo stesso autore ha messo in evidenza la capacità battericida della nisina associata ad MTA, non solo nei confronti di *E. faecalis*, ma anche nei confronti di altri batteri Gram-positivi quali, *L. fermenti*, *L. paracasei*, *A. viscosus*, *A. naeslundii* e *S. gordonii* (96).

Nel 2014, Winfred et al. hanno testato 11 peptidi sintetici valutandone la biocompatibilità e l'azione inibitoria di nei confronti di *E. faecalis*, *S. aureus*, *Streptococcus spp.* e *C. albicans* in stato planctonico e di biofilm. Degli 11 peptidi testati, VSL2 e VS2 hanno mostrato i migliori risultati. In particolare, VSL2 ha mostrato una capacità di ridurre la formazione di biofilm di *E. faecalis* su dischetti di dentina maggiore rispetto alla clorexidina. (97).

Eckhard et al., nel 2014, hanno valutato l'azione di 5 differenti peptidi (hBD3, C16-KGGK, C16-KKK, C16-KAAK e C16-KLLK) su *E. faecalis*. Il peptide che ha dimostrato essere il più attivo nei confronti del batterio è stato C16-KGGK. Anche il peptide hBD3, ad alte concentrazioni, ha dimostrato una buona attività battericida nei confronti di *E. faecalis*, tuttavia gli autori hanno sottolineato che il suo costo elevato e la necessità di operare a concentrazioni elevate ne precludono, per il momento, una sua applicazione clinica (98).

Wang et al., nel 2015, hanno valutato l'azione del peptide 1018, da solo o in associazione con la clorexidina, nei confronti di biofilm composto da specie batteriche provenienti da prelievi clinici di placca dentale. Il peptide 1018 ha dimostrato una modesta attività nei confronti del biofilm prodotto da un ampio range di specie batteriche. Tuttavia, il peptide ha mostrato un'azione sinergica in combinazione con la clorexidina (74).

Nel 2016, Zhang et al. hanno valutato l'effetto dei peptidi DJK-5 e 1018 da soli o in combinazione con clorexidina nei confronti del biofilm orale proveniente da prelievi clinici e cresciuto su dischetti di idrossiapatite (HA). La combinazione di DJK-5 con clorexidina ha dato i migliori risultati (99).

Caiaffa et al., nel 2017, hanno valutato l'azione di 3 peptidi, rispettivamente LL-37, KR-12-a5 e hBD-3-1C, confrontandola con quella della clorexidina. Rispetto a quest'ultima, i tre peptidi si sono dimostrati meno citotossici nei confronti di fibroblasti. Tra i peptidi testati, KR-12-a5 ha dimostrato una più alta attività battericida nei confronti di *E. faecalis*, *S. mutans*, *A. israelii*, *F. nucleatum* e *P. gingivalis*. In particolare l'attività nei confronti di *E. faecalis* era paragonabile a quella della clorexidina. LL-37 è risultato inefficace nei confronti di *E. faecalis*. (100).

Kajwadkar et al., nel 2017, hanno pubblicato un articolo riguardante l'utilizzo di nisina da sola o in

combinazione con l'ipoclorito di sodio, valutandone l'efficacia nei confronti del biofilm e della popolazione planctonica di *E. faecalis*. Per quanto riguarda l'effetto della nisina, questa ha inibito la crescita di *E. faecalis* sia in forma planctonica che di biofilm. L'aggiunta di una bassa concentrazione di ipoclorito di sodio ne ha migliorato l'effetto anti-biofilm (34).

Nel 2017, Lima et al. hanno valutato l'azione dei peptidi clavanina A, clavanina A modificata e LL-37, confrontandola con l'azione dell'idrossido di calcio, nei confronti di *C. albicans* ed *E. faecalis*. Fra queste sostanze, LL-37 ha dimostrato un miglior potenziale antibatterico nei confronti di *E. faecalis* (101).

Nello stesso anno, Wang et al. hanno valutato l'effetto del peptide DJK-5 da solo o in associazione con EDTA. Il peptide è risultato efficace nell'esplicare la sua attività battericida su biofilm di *E. faecalis* formati su dischetti di dentina (102).

Complessivamente, questi studi *in vitro* dimostrano che alcuni fra i peptidi testati posseggono proprietà antibatteriche e di biocompatibilità tali da renderli potenziali candidati per lo sviluppo di nuove strategie di decontaminazione in ambito endodontico. Ulteriori studi *in vitro* e *in vivo* saranno necessari per selezionare le sostanze più efficaci, valutarne l'azione nei confronti di altre specie microbiche rispetto quelle già saggiate, definirne le modalità di impiego ed evidenziarne eventuali effetti negativi.

Pravalenza di *Candida* spp. nelle infezioni endodontiche: revisione sistematica e meta-analisi

Riassunto

La presenza di *Candida* nelle infezioni endodontiche è stata indagata in numerosi studi ma il suo ruolo come patogeno endodontico è ancora dibattuto. Scopo di questo studio è effettuare una revisione sistematica della letteratura sulla prevalenza di *Candida* nei canali radicolari infetti. La ricerca è stata condotta utilizzando le più importanti banche dati biomediche e ulteriori studi sono stati selezionati dalle bibliografie degli articoli rilevanti. La qualità degli studi è stata valutata utilizzando una versione modificata della Joanna Briggs Institute Critical Appraisal Checklist. Dagli iniziali 2225 studi selezionati, 2118 sono stati esclusi sulla base della valutazione del titolo e dell'abstract. Dei rimanenti 107 studi, 50 sono stati esclusi dopo l'analisi del full-text e 57 studi sono stati inclusi per l'analisi qualitativa e quantitativa. La prevalenza combinata di *Candida* spp. nelle infezioni endodontiche è stata 8,20% (intervallo di confidenza al 95%: 5,56-11,21%). La specie più frequentemente isolata è stata *Candida albicans*. E' stata osservata una significativa eterogeneità fra gli studi ($P < 0.001$, $I^2 = 86.07\%$). L'analisi dei sottogruppi ha mostrato una prevalenza di *Candida* spp. significativamente più alta nei campioni provenienti dal continente africano. Considerando complessivamente tutti gli studi, un rischio di bias alto o incerto era prevalente per 6 degli 8 items utilizzati per la valutazione qualitativa. *Candida* è presente in una piccola proporzione di canali infetti. Ulteriori studi sono necessari per chiarire il reale contributo di *Candida* spp. nell'ecologia microbica delle infezioni endodontiche.

Background

La specie appartenenti al genere *Candida* comprendono microrganismi diploidi sessuati appartenenti al regno dei funghi e sono presenti nel microbiota umano come normali commensali. La presenza di *Candida* spp. è generalmente asintomatica e si in una significativa percentuale di individui sani, con una più alta prevalenza nei bambini, nei giovani adulti e nei soggetti ospedalizzati (103). Il passaggio

da innocuo commensale a patogeno è complesso e coinvolge aspetti legati all'ospite e al micete. Lo sviluppo di una candidosi è il risultato di uno squilibrio fra i fattori di virulenza fungini e le difese dell'ospite. Le infezioni causate da *Candida* sono generalmente localizzate e superficiali, ma, in pazienti immunocompromessi, il coinvolgimento può essere sistemico con un alto tasso di mortalità (104). Sono state descritte tre varianti di candidosi orale primaria (pseudomembranosa, eritematosa e cronica iperplastica) e delle specifiche lesioni associate a *Candida* (stomatite da protesi, cheilite angolare, glossite romboide mediana e eritema gengivale lineare) (104).

Candida albicans è la specie più frequentemente isolate nel cavo orale ma sono state identificate anche altre specie, come *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida inconspicua*, *Candida dubliniensis* and *Candida tropicalis* (105).

Oltre alle candidosi delle mucose, *Candida* è coinvolta anche nelle due più frequenti infezioni orali: la patologia cariosa e la malattia parodontale. In entrambe le condizioni, questo micete non è considerato un patogeno primario, ma le attuali evidenze suggeriscono un ruolo subordinato, possibilmente in sinergia con i classici batteri patogeni (106, 107).

Candida spp. sono state riscontrate in canali infetti con una prevalenza che varia dallo 0,5 al 55% a seconda degli studi (108). Questi miceti posseggono dei fattori di virulenza che conferiscono loro la capacità di determinare lo sviluppo della patologia endodontica. Infatti, sono in grado di adattarsi a diverse condizioni ambientali e di aderire a diverse superfici incluse la dentina e i materiali da otturazione canalare (46), inoltre *C. albicans* può produrre enzimi idrolitici, formare biofilm ed eludere le difese dell'ospite (45). *Candida* è considerata più frequente nelle infezioni endodontiche secondarie/persistenti rispetto alle infezioni primarie (45), ma i dati attualmente disponibili sono piuttosto contraddittori.

Con l'obiettivo di fare chiarezza sul ruolo di *Candida* spp. nelle infezioni endodontiche, è stata effettuata una revisione sistematica della letteratura per rispondere alle seguenti domande:

1. Qual è la prevalenza di *Candida* spp. nelle infezioni endodontiche?
2. Quali sono le specie appartenenti al genere *Candida* isolate nelle infezioni endodontiche?

3. Quali sono le variabili metodologiche degli studi e le variabili cliniche delle infezioni endodontiche che spiegano l'eterogeneità nei risultati?

Materiali e metodi

Il protocollo della revisione sistematica è stato redatto seguendo le indicazioni del Joanna Briggs Institute (109) ed è stato registrato sul database PROSPERO (CRD42017053037).

Criteri di eleggibilità/ineleggibilità

Sono stati inclusi tutti gli che soddisfacevano tutti i seguenti criteri di eleggibilità:

Disegno dello studio:

- studi di tipo osservazionale (studi di coorte, studi caso controllo, studi trasversali)
- sperimentale (studi con disegno pre-post, trial clinici non-randomizzati, trial clinici randomizzati controllati, trial clinici randomizzati controllati di tipo crossover)

Partecipanti:

- studi su umani di qualsiasi età e di entrambi i sessi con infezioni di origine endodontica in denti permanenti

Intervento:

- ricerca di *Candida* spp. con metodiche colturali e/o molecolari

Outcome:

- prevalenza di *Candida* spp. nel campione dello studio

Gli studi sono stati esclusi se non soddisfacevano almeno 1 criterio di eleggibilità o se presentavano uno dei seguenti criteri di ineleggibilità:

- case report e case series
- studi su denti decidui
- tasso di prevalenza di *Candida* spp. non dichiarati o mancanza di dati per calcolarlo
- studi che non valutavano la presenza di almeno una specie di *Candida*
- studi che non descrivevano chiaramente la metodica per la ricerca di *Candida* spp.
- studi che valutavano la presenza di funghi all'esterno del canale radicolare

- studi che effettuavano il campionamento dopo aver utilizzato lavaggi canalari o paste medicamentose o senza adeguate misure per ridurre il rischio di contaminazione microbica

Non sono state imposte restrizioni di lingua, area geografica o data di pubblicazione.

Strategia di ricerca

La strategia di ricerca bibliografica, concordata con una bibliotecaria esperta in revisioni sistematiche in ambito bio-medico, è realizzata usando termini del Medical Subject Heading e parole libere inerenti l'oggetto della revisione. La ricerca bibliografica è effettuata nei database elettronici di MEDLINE usando PubMed, di Science Citation Index Expanded (SCIexpanded) usando Web of Science, di Scopus, di Embase e del Cochrane Library database.

La seguente strategia di ricerca per Medline via Pubmed è stata adattata agli altri database elettronici:

((("Fungi"[Mesh] OR "Yeasts"[Mesh] AND ("Endodontics"[Mesh] OR "Dental Pulp Diseases"[Mesh] OR "Periapical Diseases"[Mesh] OR "Dental Pulp Cavity/microbiology"[Mesh]))) OR ("periapical disease" OR "periapical lesion*" OR "periapical periodontitis" OR "periapical radiolucency" OR "periradicular abscess*" OR "apical lesion*" OR "dental pulp*" OR "necrotic pulp*" OR "apical periodontitis" OR "endodontic" OR "root canal*" OR "dental infection*" OR "tooth infection*" OR "root fill*") AND ("candida" OR "candidal" OR Fung* OR Yeast* OR myco* OR microbiota OR "candidiadis"))).*

Tutti i passaggi della ricerca sono stati documentati e registrati per permettere eventuali aggiornamenti. Per assicurare la completezza della ricerca bibliografica sono state controllate le bibliografie degli articoli inclusi o delle revisioni rilevanti identificate durante la ricerca.

Selezione degli articoli

La selezione degli articoli rilevanti tra quelli individuati attraverso la ricerca bibliografica precedentemente descritta è stata effettuata in base ai criteri di eleggibilità/ineleggibilità. Questa selezione è stata effettuata in due passaggi. Inizialmente è stato eseguito uno screening sulla base del

titolo e dell'abstract e per tale selezione è stata utilizzata una piattaforma web (rayyan.qcri.org) (110). Successivamente, per gli studi che sono risultati potenzialmente rilevanti e per quelli che non è stato possibile escludere sulla base del titolo e dell'abstract, è stato esaminato il full-text. Sulla base dell'analisi del full-text è stata effettuata la selezione finale degli articoli da includere nella revisione sistematica. Per tutti gli articoli scartati nel secondo passaggio è stata registrata la motivazione della non inclusione attraverso un apposito form.

La selezione degli articoli rilevanti è stata effettuata da 2 operatori in modo indipendente. Gli operatori non erano in cieco rispetto gli autori, le affiliazioni e le riviste degli articoli da selezionare. Eventuali disaccordi sull'inclusione/esclusione di alcuni articoli sono stati risolti attraverso un confronto fra gli operatori. Nel caso non si fosse giunto ad un accordo, la decisione finale è stata presa coinvolgendo un terzo operatore.

Estrazione dei dati

E' stato utilizzato un form predefinito per l'analisi e la raccolta dei dati degli articoli selezionati. Per ogni studio è stato registrato il titolo, gli autori, l'anno di pubblicazione, la rivista, la lingua, i criteri di inclusione dei pazienti, la loro nazionalità, il metodo di ricerca dei miceti, il sito di prelievo del materiale da analizzare, la modalità di prelievo del materiale da analizzare, le specie di *Candida* isolate e la loro frequenza, la tipologia di infezione endodontica, il numero di casi positivi a *Candida* spp. / casi totali, il numero di casi positivi a *Candida* spp. / casi infezione primaria, il numero di casi positivi a *Candida* spp. / casi infezione secondaria, il numero di casi positivi a *Candida* spp. / casi infezione sintomatica, il numero di casi positivi a *Candida* spp. / casi infezione asintomatica. Il form è stato precedentemente testato su un piccolo gruppo di articoli per valutarne l'utilizzabilità e la completezza. L'estrazione dei dati è stata effettuata da un solo operatore. Un altro operatore in modo indipendente ha controllato la completezza e l'accuratezza dei forms compilati. Ogni disaccordo è stato annotato e risolto tramite discussione fra i due operatori. Nel caso non si fosse giunti ad un accordo, la decisione finale è stata presa coinvolgendo un terzo operatore. Quando necessario si è

proceduto alla traduzione dei full text scritti in lingua diversa dall'inglese. Il form di estrazione dei dati è stato preventivamente testato su un numero ridotto di studi.

Format estrazione dati

Codice articolo:

Informazioni generali

Titolo:

Autori:

Citazione:

Lingua:

Nazionalità:

Caratteristiche dello studio

Tipologia di studio

Obiettivi dello studio:

Criteri di inclusione/esclusione pazienti:

Metodo di ricerca miceti:

Sito di campionamento:

Modalità di prelievo:

Età dei pazienti:

Specie di *Candida* isolate (e rapporto singola specie su casi totali):

Tipologia di infezione endontica:

Casi positivi a *Candida* spp. / casi totali:

Casi positivi a *Candida* spp. / casi infezione primaria:

Casi positivi a *Candida* spp. / casi infezione secondaria:

Casi positivi a *Candida* spp. / casi infezione sintomatica:

Casi positivi a *Candida* spp. / casi infezione asintomatica:

Valutazione del rischio di bias:

Note:

Operatore e data della compilazione:

Valutazione del rischio di bias

Per la valutazione del rischio di bias degli studi eleggibili è stata utilizzata la JBI Prevalence Critical Appraisal Checklist modificata per adeguarla alle caratteristiche dell'oggetto della revisione (111). Il criterio sull'appropriatezza dell'analisi statistica non è stato considerato in quanto ritenuto irrilevante ai fini della revisione. La checklist, nonostante sia stata progettata per valutare il rischio di bias di studi di prevalenza, è stata utilizzata anche per gli studi sperimentali da cui sono state estratte esclusivamente le informazioni relative alla presenza di *Candida* spp. nelle infezioni endodontiche, tralasciando tutti gli altri risultati. Nella Tabella 1 è riportata la spiegazione di ogni item.

Tabella 1. Checklist per la valutazione del rischio di bias.

Item	Spiegazione
Target population	Un bias di livello basso è assegnato se i soggetti sono stati reclutati da settings rappresentativi, come cliniche odontoiatriche
Participant recruitment	Un bias di livello basso è stato assegnato se i soggetti arruolati erano non selezionati (pazienti consecutivi) e se i criteri di inclusione/esclusione erano chiaramente esplicitati
Sample size	Un bias di livello basso è stato assegnato agli studi con un numero di denti campionati ≥ 106 . Infatti, in base ai dati della letteratura, circa il 7.5% dei canali infetti contiene funghi (9) Secondo la formula di Daniel $n = Z^2 * P(1 - P) / d^2$ (112), un campione di 106 denti è necessario per stimare la prevalenza di <i>Candida</i> spp. con una precisione del 5% in un intervallo di confidenza al 95%.
Subject and setting description	Un bias di livello basso è stato assegnato se venivano fornite informazioni sull'età e sesso dei soggetti e sul tipo di infezione endodontica.
Coverage bias	Un bias di livello basso è stato assegnato se vi era un rischio basso che alcuni sottogruppi della popolazione fossero sotto- o sovra-rappresentati
Classification bias	Un bias di livello basso è stato assegnato se la tecnica

	per determinare la presenza di <i>Candida</i> spp. era ritenuta deguata.
Measurement bias	Un bias di livello basso è stato assegnato se le misure per evitare la contaminazione dei campioni erano ritenute adeguate e se il campionamento era stato effettuato dallo stesso operatore.
Response rate	Un bias di livello basso è stato assegnato se un numero basso di pazienti (<10%) potenzialmente arruolabili aveva rifiutato di partecipare allo studio e se un numero basso di campioni (<10%) era stato scartato per non aver superato il controllo di sterilità

Le checklists sono state compilate in modo indipendente da 2 revisori. Ogni disaccordo è stato annotato e risolto tramite discussione fra i due operatori. Nel caso non si fosse giunto ad un accordo, la decisione finale è stata presa coinvolgendo un terzo operatore.

Metodi statistici della meta-analisi

L'outcome primario dello studio consiste nella stima della proporzione delle colture positive per *Candida* spp. nei canali radicolari di denti con infezione endodontica derivante dalla combinazione dei risultati degli studi selezionati. Per ogni studio incluso nella meta-analisi è stata calcolata la proporzione delle colture positive per *Candida* spp. ed il rispettivo intervallo di confidenza al 95%. Successivamente è stata effettuata la meta-analisi per ottenere una stima cumulativa con i rispettivi intervalli di confidenza e, presupponendo un certo grado di eterogeneità tra gli studi, si è fatto ricorso al modello random-effects secondo il metodo di DerSimonian e Laird (113). Il risultato è stato illustrato nella forma classica del forest-plot in cui i risultati dei singoli studi sono stati riportati come proporzione riscontrata e corrispondenti intervalli di confidenza; ogni studio è rappresentato da un quadrato di dimensioni proporzionali al peso dello studio nella meta-analisi. Il risultato cumulativo è rappresentato come un rombo in cui l'angolo al vertice è centrato sul valore medio cumulativo risultato dalla meta-analisi e la larghezza corrisponde all'intervallo di confidenza. L'eterogeneità tra

gli studi è stata inizialmente valutata ispezionando il forest-plot prodotto dalla meta-analisi e successivamente applicando la statistica Cochran Q e il metodo dell' I^2 . Quando possibile, con il metodo della meta-regressione, sono state ricercate quelle covariate legate alla eterogeneità riscontrata.

Poiché l'oggetto della meta-analisi è rappresentato dalla prevalenza di *Candida* spp. in infezioni endodontiche e poiché la maggior parte degli studi inclusi sono studi di tipo osservazionale di coorte che non comportavano quindi confronti tra gruppi, si potrebbe mettere in dubbio la pertinenza di uno studio del bias di pubblicazione mediante il funnel plot (114). Tuttavia, come suggerito da Sterne et al. (115), il funnel plot va considerato non tanto come mezzo per dimostrare uno specifico tipo bias di pubblicazione, quanto come uno strumento per esaminare lo "small study effect", cioè la tendenza che hanno gli studi di dimensione minore di evidenziare risultati più importanti. Per questo motivo si è ritenuto utile procedere anche con questo tipo di analisi. Il funnel plot è stato disegnato riportando, su un asse cartesiano, la prevalenza di *Candida* spp. riscontrata nei vari studi sull'asse delle ascisse e il corrispondente errore standard sull'asse delle ordinate. L'errore standard è un indicatore della dimensione dello studio, in quanto tanto più piccola è la dimensione del campione tanto più grande è l'errore standard sull'asse delle ordinate. Sull'asse delle ordinate il valore dell'errore standard cresce dall'alto verso il basso. In assenza di "small study effect" i risultati degli studi più piccoli dovrebbero distribuirsi simmetricamente attorno al valore medio, conferendo al diagramma un aspetto triangolare (simile ad un imbuto, di qui il nome funnel plot).

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software Stata 13 (Stata Corporation, College Station, TX) con il comando metaprop in modo da non escludere quegli eventuali studi che avessero riportato una proporzione dello 0% o del 100%.

Risultati

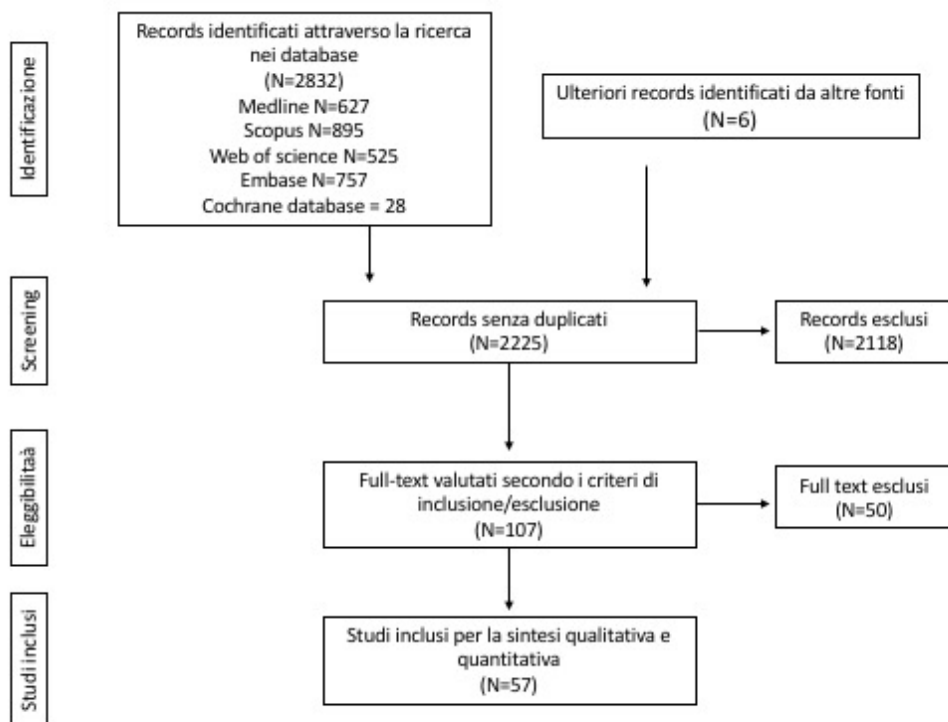


Figura 13. Diagramma di flusso della selezione degli studi.

Il processo di selezione degli studi è mostrato in Figura 13. Attraverso la ricerca nei database elettronici sono stati individuati 2832 records (627 in Medline, 895 in Scopus, 525 in SCiexpanded, 757 in Embase e 28 in Cochrane Database). Ulteriori 6 records sono stati identificati dalla bibliografia della revisione sistematica di Persoon et al. (9). Dai 2583 records sono stati eliminati 613 duplicati. 2225 records sono stati valutati in base al titolo e all'abstract, tra questi 2118 sono stati esclusi sulla base dei criteri di eleggibilità e ineleggibilità. È stata effettuata quindi la selezione sulla base del full text fra i rimanenti 107 records. 57 studi sono stati inclusi per la sintesi qualitativa e quantitativa, mentre 50 sono stati esclusi.

Nella Tabella 2 è riportato l'elenco degli studi esclusi e le rispettive motivazioni. In tutti i 57 studi inclusi, ad esclusione di quello di Persoon et al. (108) in cui la valutazione è stata effettuata sull'intero dente estratto, il prelievo del campione è stato effettuato con coni di carta e/o file. La somma totale degli elementi dentari da cui sono stati effettuati i prelievi è 3615. Gli studi selezionati sono stati

pubblicati in un range di tempo che va dal 1961 al 2017 e sono stati condotti in 23 nazioni diverse. Dei 57 studi, 30 consideravano elementi dentari con infezioni endodontiche primarie (108, 116-144), 15 con infezioni secondarie (25, 27, 28, 133, 145-155) mentre 7 studi includevano sia infezioni primarie che secondarie (156-162). Cinque studi non riportavano il tipo di infezione endodontica (163-167). Otto studi non hanno riscontrato presenza di *Candida* spp. (118, 133, 137, 139-141, 148, 159, 168). La prevalenza più alta è stata riportata nello studio di Persoon et al. (100%) (108). *C. albicans* è stata riscontrata in 39 dei 57 studi considerati (26-28, 108, 117, 119-124, 127, 129, 131, 132, 134, 135, 138, 142-144, 146, 147, 149-158, 160, 163-167), rappresentando la specie più frequente. *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. Krusei*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* e *C. etchllsii* sono state riscontrate in 5 (20, 27, 34, 57, 64), 3 (21, 28, 48), 3 (21, 54, 60), 2 (6, 48), 2(48, 57), 2 (6, 57), 1 (57) and 1 (6) studi, rispettivamente.

Nella

Tabella 3 e nella Tabella 4 sono riportate le caratteristiche dei 57 studi inclusi.

Tabella 2. Articoli esclusi e motivi dell'esclusione.

Primo autore (anno)	Titolo	Motivo dell'esclusione
Seltzer (1950)(169)	Antibiotic in the treatment of yeast like infections of the root canal	<i>Candida</i> spp. non cercate
Slack (1953)(170)	The bacteriology of infected root canals and <i>in vitro</i> penicillin sensitivity	Campionamento/ricerca di <i>Candida</i> spp./pazienti incompatibili con i criteri di inclusione
Bartels (1954)(171)	Yeastlike microorganisms isolated from root canals	Campionamento/ricerca di <i>Candida</i> spp./pazienti incompatibili con i criteri di inclusione
Slack (1957)(172)	The resistance to antibiotics of microorganisms isolated from root canals	Campionamento/ricerca di <i>Candida</i> spp./pazienti incompatibili con i criteri di inclusione
Macdonald (1957)(173)	The bacteriologic status of the pulp chambers in intact teeth found to be nonvital following trauma	Prevalenza di <i>Candida</i> spp. non riportata chiaramente
Hobson (1959)(174)	An investigation into the bacteriological control of infected root canals	Prevalenza di <i>Candida</i> spp. non riportata chiaramente
Jackson (1963)(175)	Incidence of yeasts in root canals during therapy	Prevalenza di <i>Candida</i> spp. non riportata chiaramente
Engstrom (1964)(176)	Experiences of bacteriological root canal control	Prevalenza di <i>Candida</i> spp. non riportata chiaramente
Nyarady (1965)(177)	Fungal structures in dentin, dental pulp and granuloma: preliminary report	Prevalenza di <i>Candida</i> spp. non riportata chiaramente
Wilson (1968)(178)	Incidence of yeasts in root canals	Campionamento/ricerca di <i>Candida</i> spp./pazienti incompatibili con i criteri di inclusione
Goldman (1969)(179)	Postdébridement bacterial flora and antibiotic	Campionamento/ricerca di <i>Candida</i> spp./pazienti

	sensitivity	incompatibili con i criteri di inclusione
Najzar-Fleger (1971)(180)	Seasonal incidence of yeastlike fungi in the root canal	Dati non originali
Borea (1974) (181)	Bacteriological studies of the bacterial flora of acute dental infections	Campionamento/ricerca di <i>Candida</i> spp./pazienti incompatibili con i criteri di inclusione
Akpata (1974)(182)	Total viable count of microorganisms in the infected dental pulp	<i>Candida</i> spp. non cercate
Tinkl (1975)(183)	Clinical and microbiological observations in the antibiotic therapy of pulp gangrene	Prevalenza di <i>Candida</i> spp. non riportata chiaramente
Ferenczi (1979)(184)	Incidence of <i>Candida</i> in gangrenous root canals	Dati non originali
Matusow (1981)(185)	Acute pulpal-alveolar cellulitis syndrome. III. Endodontic therapeutic factors and the resolution of a <i>Candida albicans</i> infection	Case report
Nair (1987)(32)	Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions	Campionamento/ricerca di <i>Candida</i> spp./pazienti incompatibili con i criteri di inclusione
Nair (1990)(186)	Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study	Campionamento/ricerca di <i>Candida</i> spp./pazienti incompatibili con i criteri di inclusione
Pepe (1992)(187)	The first isolation of <i>Torulopsis glabrata</i> (Anderson) Lodder from dental granulomas	Campionamento/ricerca di <i>Candida</i> spp./pazienti incompatibili con i criteri di inclusione
Najzar-Fleger (1992)(188)	<i>Candida</i> in root canal in accordance with oral ecology	Prevalenza di <i>Candida</i> spp. non riportata chiaramente
Drozdova (1996)(189)	The evaluation of the root canal microflora in periapical	<i>Candida</i> spp. non cercate

	periodontitis in Saint-Petersburg residents in different years	
Siren (1997)(190)	Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation	Campionamento/ricerca di <i>Candida</i> spp./pazienti incompatibili con i criteri di inclusione
Waltimo (1997)(191)	Fungi in therapy-resistant apical periodontitis	Prevalenza di <i>Candida</i> spp. non riportata chiaramente
Watts (2000)(192)	Detection of <i>Candida albicans</i> in infected root canals using PCR	Dati non originali
Waltimo (2000)(193)	<i>Candida albicans</i> biotypes in persistent root canal infections in a Finnish population	Campionamento/ricerca di <i>Candida</i> spp./pazienti incompatibili con i criteri di inclusione
Waltimo (2001)(194)	Phenotypes and randomly profiles of <i>Candida albicans</i> isolates from root canal infections in a Finnish population	Campionamento/ricerca di <i>Candida</i> spp./pazienti incompatibili con i criteri di inclusione
Sunde (2002)(195)	Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy	Campionamento/ricerca di <i>Candida</i> spp./pazienti incompatibili con i criteri di inclusione
Siqueira (2002)(196)	Patterns of microbial colonization in primary root canal infections	Campionamento/ricerca di <i>Candida</i> spp./pazienti incompatibili con i criteri di inclusione
Cassandrum (2002)(197)	Occurrence of <i>Enterococcus faecalis</i> and <i>Candida albicans</i> in root canal infections	Campionamento/ricerca di <i>Candida</i> spp./pazienti incompatibili con i criteri di inclusione
Akdeniz (2002)(198)	Prevalence of <i>Candida albicans</i> in oral cavities and root canals of children	Campionamento/ricerca di <i>Candida</i> spp./pazienti incompatibili con i criteri di inclusione
Waltimo (2003)(199)	Examination on <i>Candida</i> spp. In refractory periapical granulomas	Campionamento/ricerca di <i>Candida</i> spp./pazienti incompatibili con i criteri di inclusione

Adib (2004) (200)	Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study	Prevalenza di <i>Candida</i> spp. non riportata chiaramente
Lacevic (2005)(201)	Bacterial aggregation in infected root canal	Prevalenza di <i>Candida</i> spp. non riportata chiaramente
Rossi-Fedele (2006)(202)	Incidence and behaviour of Tn916-like elements within tetracycline-resistant bacteria isolated from root canals	Campionamento/ricerca di <i>Candida</i> spp./pazienti incompatibili con i criteri di inclusione
Chu (2006)(168)	Identification of cultivable microorganisms from root canals with apical periodontitis following two-visit endodontic treatment with antibiotics/steroid or calcium hydroxide dressings	Dati non originali
Rodriguez (2008)(203)	Pulp microbiology of complete teeth with idiopathic apical lesions	Prevalenza di <i>Candida</i> spp. non riportata chiaramente
Blome (2008)(204)	Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using realtime polymerase chain reaction	Prevalenza di <i>Candida</i> spp. non riportata chiaramente
Zhang (2010)(205)	Identification of dominant pathogens in periapical lesions associated with persistent with persistent apical periodontitis	Campionamento/ricerca di <i>Candida</i> spp./pazienti incompatibili con i criteri di inclusione
Gomes (2010)(206)	Isolation and taxonomy of filamentous fungi in endodontic infections	<i>Candida</i> spp. non cercate
Al-Ahmad (2012)(207)	Diversity of the endodontic microbiota of infected root-filled teeth with periradicular lesions	Prevalenza di <i>Candida</i> spp. non riportata chiaramente
Teles (2013)(208)	Identification of yeast and non-pigmented cultivable	Prevalenza di <i>Candida</i> spp. non riportata chiaramente

	endodontic bacteria in adult Portuguese patients	
Signoretti (2013)(209)	Investigation of cultivable bacteria Isolated from longstanding retreatment-resistant lesions of teeth with apical periodontitis	Campionamento/ricerca di <i>Candida</i> spp./pazienti incompatibili con i criteri di inclusione
Kovac (2013)(210)	<i>Enterococcus faecalis</i> and <i>Candida albicans</i> in the dental root canal and periapical infections	Campionamento/ricerca di <i>Candida</i> spp./pazienti incompatibili con i criteri di inclusione
Zakaria (2014)(211)	Microbial community in persistent apical periodontitis: a 16S rRNA gene clone library analysis	Campionamento/ricerca di <i>Candida</i> spp./pazienti incompatibili con i criteri di inclusione
Kumar (2015)(212)	Presence of <i>Candida albicans</i> in root canals of teeth with apical periodontitis and evaluation of their possible role in failure of endodontic treatment	Campionamento/ricerca di <i>Candida</i> spp./pazienti incompatibili con i criteri di inclusione
Asnaashari (2016)(213)	The antibacterial effect of additional photodynamic therapy in failed endodontically treated teeth: A pilot study	Prevalenza di <i>Candida</i> spp. non riportata chiaramente
Henriques (2016)(214)	Microbial ecosystem analysis in root canal infections refractory to endodontic treatment	Prevalenza di <i>Candida</i> spp. non riportata chiaramente
Sundaram (2016)(215)	A comparative evaluation on antimicrobial effect of honey, neem leaf extract and sodium hypochlorite as intracanal irrigant: an <i>ex-vivo</i> study	Campionamento/ricerca di <i>Candida</i> spp./pazienti incompatibili con i criteri di inclusione
Ramkumar (2017)(216)	Effect of <i>Garcinia Imberti</i> Bourd against <i>Candida</i> isolates in rootcanal infection	Prevalenza di <i>Candida</i> spp. non riportata chiaramente

Tabella 3. Caratteristiche degli studi inclusi nella revisione.

Studio	Nazione	Tecnica d'identificazione	Tipo di infezione	Dimensione campionaria	Prevalenza di <i>Candida</i> spp. %	Specie di <i>Candida</i> identificate (numero di casi)
Crawford 1961 (163)	Stati Uniti	Colturale	n/a	57	3.50	<i>C.albicans</i> (2)
Möller 1966 (162)	Svezia	Colturale	Primaria+Secondaria	654	2.60	<i>Candida</i> spp. (17)
Möller 1966 (116)	Svezia	Colturale	Primaria	35	2.86	<i>Candida</i> spp. (1)
Najzar-Fleger 1969 (166)	Ungheria	Colturale	n/a	121	12.40	<i>C.albicans</i> (15), <i>C.tropicalis</i> (3)
Tommasi 1969 (142)	Brasile	Colturale	Primaria	226	23.89	<i>C. albicans</i> (51), <i>C. kefyr</i> (1), <i>C.parapsilosis</i> (1)
Kessler 1972 (128)	Sudafrica	Colturale	Primaria	3	33.33	<i>Candida</i> spp. (1)
Petit 1972 (161)	Francia	Colturale	Primaria+Secondaria	53	1.89	<i>Candida</i> spp (1)
Sundqvist 1976 (141)	Svezia	Colturale	Primaria	32	0.00	-
Matusow 1979 (131)	Stati Uniti	Colturale	Primaria	76	2.63	<i>C.albicans</i> (1), <i>Candida</i> spp. (1)
Ferenczi 1983 (124)	Ungheria	Colturale	Primaria	120	6.67	<i>C.albicans</i> (8)
Diaz 1995 (164)	Cile	Colturale	n/a	25	20.00	<i>C.albicans</i> (4), <i>C. Tropicalis</i> (1)
Kubo 1997 (129)	Brasile	Colturale	Primaria	62	11.29	<i>C.albicans</i> (5), <i>C. kefyr</i> (2)
Molander 1998 (26)	Svezia	Colturale	Secondaria	120	4.17	<i>C.albicans</i> (5)
Sundqvist 1998 (27)	Svezia	Colturale	Secondaria	54	3.70	<i>C.albicans</i> (2)
Molander 1999 (133)	Svezia	Colturale	Primaria	50	0.00	-
Baumgartner 2000 (117)	Stati Uniti	Molecolare	Primaria	24	20.8	<i>C.albicans</i> (4)
Hancock 2001 (28)	Stati Uniti	Colturale	Secondaria	54	1.85	<i>C.albicans</i> (1)
Lana 2001 (130)	Brasile	Colturale	Primaria	31	6.45	<i>C.Tropicalis</i> (2)
Peculien 2001 (150)	Norvegia	Colturale	Secondaria	40	15.00	<i>C.albicans</i> (6)
Cheung 2001 (147)	Cina	Colturale	Secondaria	18	11.11	<i>C.albicans</i> (2)
Egan 2002 (157)	Regno Unito	Colturale	Primaria+Secondaria	60	5.00	<i>C.albicans</i> (3)
Pinheiro 2003/1(25)	Brasile	Colturale	Secondaria	60	3.33	<i>Candida</i> spp. (2)
Pinheiro 2003/2(151)	Brasile	Colturale	Secondaria	30	3.33	<i>C.albicans</i> (1)
Tsang 2003(143)	Cina	Molecolare	Primaria	30	6.67	<i>C.albicans</i> (2)
Gomes 2004 (159)	Brasile	Colturale	Primaria+Secondaria	60	0.00	-
Siqueira 2004 (155)	Brasile	Molecolare	Secondaria	22	9.09	<i>C.albicans</i> (2)
Ferrari 2004(126)	Brasile	Colturale	Primaria	15	0.00	-
Ogude 2005 (136)	Nigeria	Colturale	Primaria	40	17.50	<i>Candida</i> spp. (7)
Chakraborty 2005 (120)	India	Colturale	Primaria	52	3.85	<i>C.albicans</i> (2)
Chu 2005 (121)	Hong Kong	Colturale	Primaria	88	1.14	<i>C.albicans</i> (1)
Ferrari 2005(125)	Brasile	Colturale	Primaria	25	4.00	<i>Candida</i> spp. (1)
Zbidi 2005 (167)	Tunisia	Colturale	n/a	30	50.00	<i>C.albicans</i> (11), <i>C.glabrata</i> (1), <i>C. Krusei</i> (1) <i>C.kefyr</i> (1)
Waltimo 2005 (144)	Cina	Colturale	Primaria	50	2.00	<i>C.albicans</i> (1)
Ercan 2006 (158)	Turchia	Colturale	Primaria+Secondaria	100	8.00	<i>C.albicans</i> (8)
Ashraf 2007 (146)	Iran	Colturale	Secondaria	60	25.00	<i>C.albicans</i> (15)
Cogulu 2008 (122)	Turchia	Molecolare	Primaria	66	3.03	<i>C.albicans</i> (2)
Rocas 2008 (154)	Germania	Molecolare	Secondaria	17	5.88	<i>C.albicans</i> (1)
Miranda 2009 (132)	Brasile	Molecolare	Primaria	168	22.62	<i>C.albicans</i> (34), <i>C.parapsilosis</i> (3), <i>Candida</i> spp. (1)
Mindere 2010 (149)	Lituania	Colturale	Secondaria	33	6.06	<i>C.albicans</i> (2)
Baumotte 2011 (118)	Brasile	Colturale	Primaria	10	0.00	-
Nastri 2011 (134)	Argentina	Colturale	Primaria	82	0.22	<i>C. albicans</i> (5), <i>C. dubliniensis</i> (9), <i>C. guilliermondii</i> (2), <i>C.Krusei</i>

Rocas 2011 (139)	Brasile	Molecolare	Primaria	47	0.00	(1), <i>C.tropicalis</i> (1)
Rocas 2011 (140)	Brasile	Molecolare	Primaria	24	0.00	-
Anderson 2012 (145)	Germania	Molecolare	Secondaria	20	5.00	<i>C.parapsilosis</i> (1)
Brito 2012 (119)	Brasile	Molecolare	Primaria	60	1.67	<i>C.albicans</i> (1)
Dumani 2012 (156)	Turchia	Molucular	Primaria+Secondaria	231	15.58	<i>C.albicans</i> (36)
Paiva 2012 (137)	Brasile	Molecolare	Primaria	27	0.00	-
Pupo Marrugo 2012(138)	Colombia	Cutural	Primaria	34	23.53	<i>C.albicans</i> (6), <i>C.tropicalis</i> (2)
Poptani 2013 (152)	India	Molecolare	Secondaria	20	35%	<i>C.albicans</i> (7)
Kaur 2014 (127)	India	Colturale	Primaria	25	4.00	<i>C.albicans</i> (1)
Karygianni 2015(148)	Germania	Molecolare	Secondaria	5	0.00	-
Lysakowska 2016 (160)	Polonia	Colturale	Primaria+Secondaria	37	5.41	<i>C.albicans</i> (2)
Ndiaye 2016 (135)	Senegal	Colturale	Primaria	50	14.00	<i>C.albicans</i> (7)
Persoon 2017 (108)	Olanda	Molecolare	Primaria	6	100.00	<i>C.albicans</i> (6), <i>C.dublinsiensis</i> (4), <i>C.etchllsii</i> (1); <i>C.Glabrata</i> (1)
Gomes 2017(165)	Brasile	Colturale	n/a	30	36.67	<i>C.albicans</i> (11)
Pourhajibagher 2017 (153)	Iran	Colturale	Secondaria	14	42.86	<i>C.albicans</i> (6)
De Miranda 2017 (123)	Brasile	Molecolare	Primaria	32	46.88	<i>C.albicans</i> (15)

Abbreviazioni: n/a = dato non disponibile

Tabella 4. Ulteriori caratteristiche degli studi inclusi.

Studio	Tecnica di campionamento	Presenza/assenza di sintomatologia	Presenza/assenza di comunicazione diretta con la cavità orale	Presenza/assenza di rediotrasparenze periapicali
Crawford 1961 (163)	P	n/a	entrambe	n/a
Moller 1966 (162)	P	n/a	n/a	n/a
Moller 1966 (116)	P	n/a	assente	n/a
Najzar-Fleger 1969 (166)	P	n/a	n/a	n/a
Tommasi 1969 (142)	P	n/a	n/a	n/a
Kessler 1972 (128)	P	n/a	n/a	assente
Petit 1974 (161)	P	n/a	assente	n/a
Sundqvist 1976 (141)	P	entrambe	assente	entrambe
Matusow 1979 (131)	P	presente	assente	n/a
Ferenczi 1983 (124)	P	n/a	n/a	n/a
Diaz 1995 (164)	P	n/a	n/a	n/a
Kubo 1997 (129)	P	n/a	n/a	n/a
Molander 1998 (26)	C	assente	n/a	Entrambe
Sundqvist 1998 (27)	P	assente	n/a	presente
Molander 1999 (133)	P	assente	n/a	presente
Baumgartner 2000 (117)	P	n/a	n/a	presente
Hancock 2001 (28)	P+F	n/a	assente	presente
Lana 2001 (130)	P	n/a	Entrambe	n/a
Peculien 2001 (150)	P	n/a	n/a	n/a
Cheung 2002 (147)	F+P	assente	assente	presente
Egan 2002 (157)	F+P	n/a	n/a	n/a
Pinheiro 2003 (25)		n/a	n/a	presente
Pinheiro 2003 (151)	P	entrambe	Entrambe	presente
Tsang 2003 (143)		n/a	n/a	n/a
Gomes 2004 (159)	P	n/a	n/a	n/a
Siqueira 2004 (155)	F+P	n/a	assente	presente
Ferrari 2004 (126)	P	n/a	assente	presente
Ogude 2005 (136)	P	n/a	n/a	n/a
Chakraborty 2005 (120)	P	n/a	assente	n/a
Chu 2005 (121)	P	n/a	Entrambe	presente
Ferrari 2005 (125)	P	assente	assente	presente
Zbidi 2005 (167)	F	entrambe	Entrambe	n/a
Waltimo 2005 (144)	P	n/a	n/a	presente
Ercan 2006 (158)	P	n/a	n/a	n/a
Ashraf 2007 (146)	F	n/a	assente	entrambe
Cogulu 2008 (122)	F+P	entrambe	n/a	entrambe
Rocas 2008 (154)	P	n/a	assente	presente
Miranda 2009 (132)	P	assente	assente	presente
Mindere 2010 (149)	P	n/a	assente	presente
Baumotte 2011 (118)	P	n/a	assente	presente
Nastri 2011 (134)	P	assente	n/a	presente
Rocas 2011 (139)	F+P	assente	assente	presente
Rocas 2011 (140)	P	assente	assente	presente
Anderson 2012 (145)	P	assente	assente	presente
Brito 2012(119)	F	n/a	n/a	presente
Dumani 2012 (156)	F+P	n/a	n/a	n/a
Paiva 2012 (137)	F+P	assente	assente	presente
Pupo Marrugo 2012 (138)	P	n/a	n/a	presente
Poptani 2013 (152)	P	presente	n/a	n/a
Kaur 2014 (127)	P	n/a	n/a	n/a
Karygianni 2015 (148)	F+P	assente	assente	presente
Lysakowska 2016 (160)	P	n/a	presente	n/a
Ndiaye 2016 (135)	P	n/a	Entrambe	n/a
Persoon 2017 (108)	T	presente	assente	presente
Gomes 2017 (165)	P	n/a	n/a	n/a
Pourhajibaghara 2017 (153)	P	n/a	n/a	n/a
De Miranda 2017 (123)	P	n/a	n/a	presente

Abbreviazioni: F = file endodontico, P = cono di carta, T = dente estratto, n/a = dato non disponibile

La prevalenza combinata di *C. albicans* nei canali radicolari di denti con infetti è stata di 8,20 % (I.C. 95%: 5,56 – 11,21%). L'analisi ha rilevato una significativa eterogeneità fra gli studi ($I^2=84.6\%$, $p < 0.01$).

La Figura 14 rappresenta il forest plot della prevalenza di *Candida* spp. nei canali di denti infetti. I quadrati e le linee orizzontali rappresentano la prevalenza stimata dallo studio e l'intervallo di confidenza al 95%. L'area del quadrato corrisponde al peso con cui ogni studio contribuisce alla meta-analisi. Il rombo rosso rappresenta la prevalenza combinata e il corrispondente intervallo di confidenza al 95%.

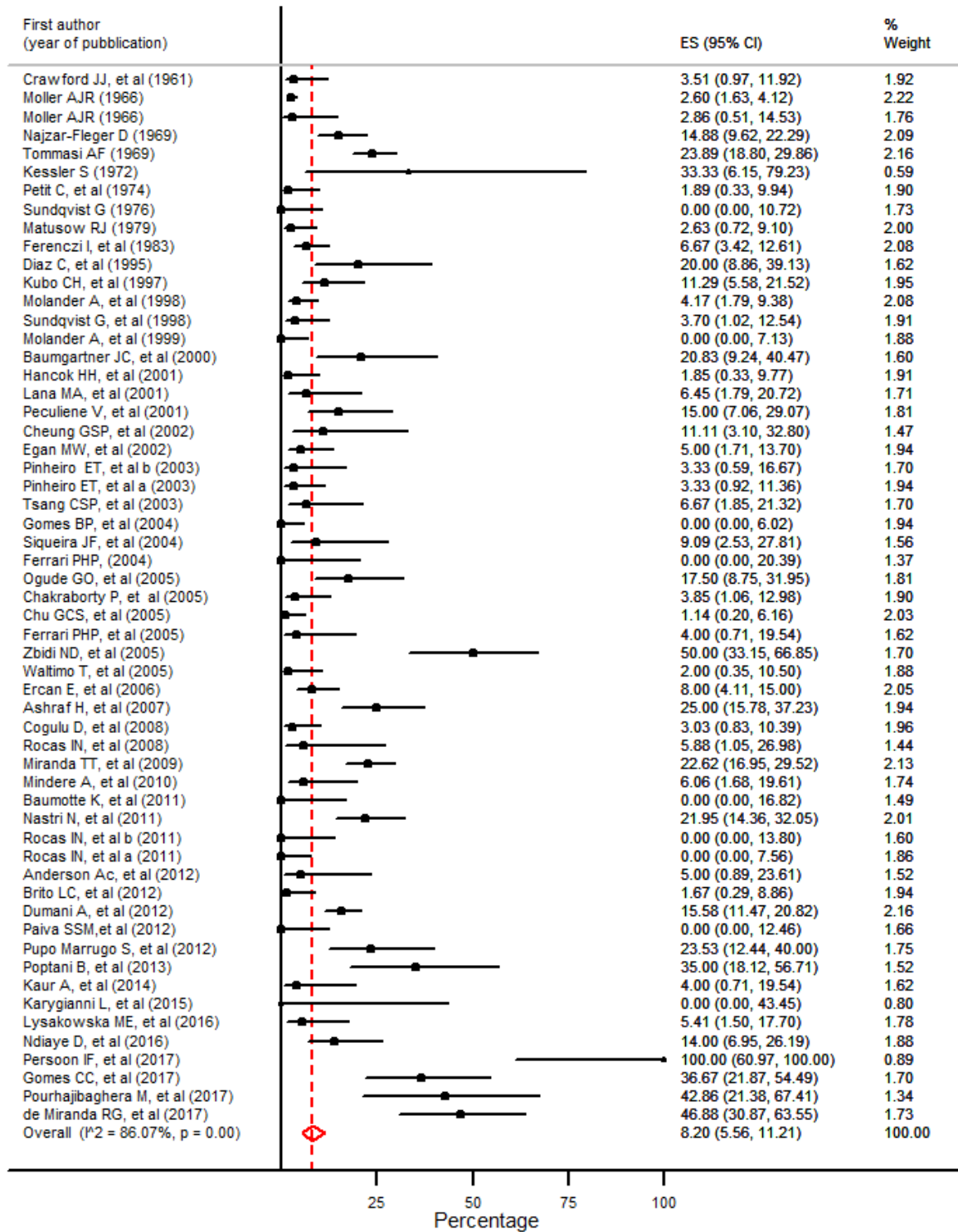


Figura 14 - Forest plot della prevalenza di *Candida* spp. nei canali radicolari infetti. I quadrati e le linee orizzontali rappresentano la prevalenza stimata e l'intervallo di confidenza al 95%. Le aree dei quadrati corrispondono al peso con cui ogni studio contribuisce alla meta-analisi. Il rombo rosso rappresenta la prevalenza combinata e il corrispondente intervallo di confidenza al 95%.

La Figura 15 rappresenta la prevalenza di *Candida* spp. in differenti sottogruppi. I singoli rombi pieni corrispondono alla stima della prevalenza del sottogruppo e all'intervallo di confidenza al 95%. Il rombo vuoto e la linea tratteggiata verticale corrispondono alla prevalenza nella popolazione generale. L'analisi per sottogruppi è stata condotta considerando la data di pubblicazione, la localizzazione geografica, il tipo di infezione, la presenza di comunicazione diretta fra i canali e il cavo orale, la presenza/assenza di lesioni periapicali radiotrasparenti e la tecnica di identificazione dei microrganismi. Gli studi provenienti dal continente africano riportavano una più alta prevalenza di *Candida* spp. (24,82% CI: 7,8% - 46,2%, P = 0.041), mentre gli altri sottogruppi non sono state rilevate differenze statisticamente significative.

La valutazione del rischio di bias è stata effettuata usando JBI Critical appraisal checklist ed è riportata nella Tabella 5 e riassunta nella Figura 16. In generale, un rischio di bias alto o incerto era frequente in 6 degli 8 items considerati.

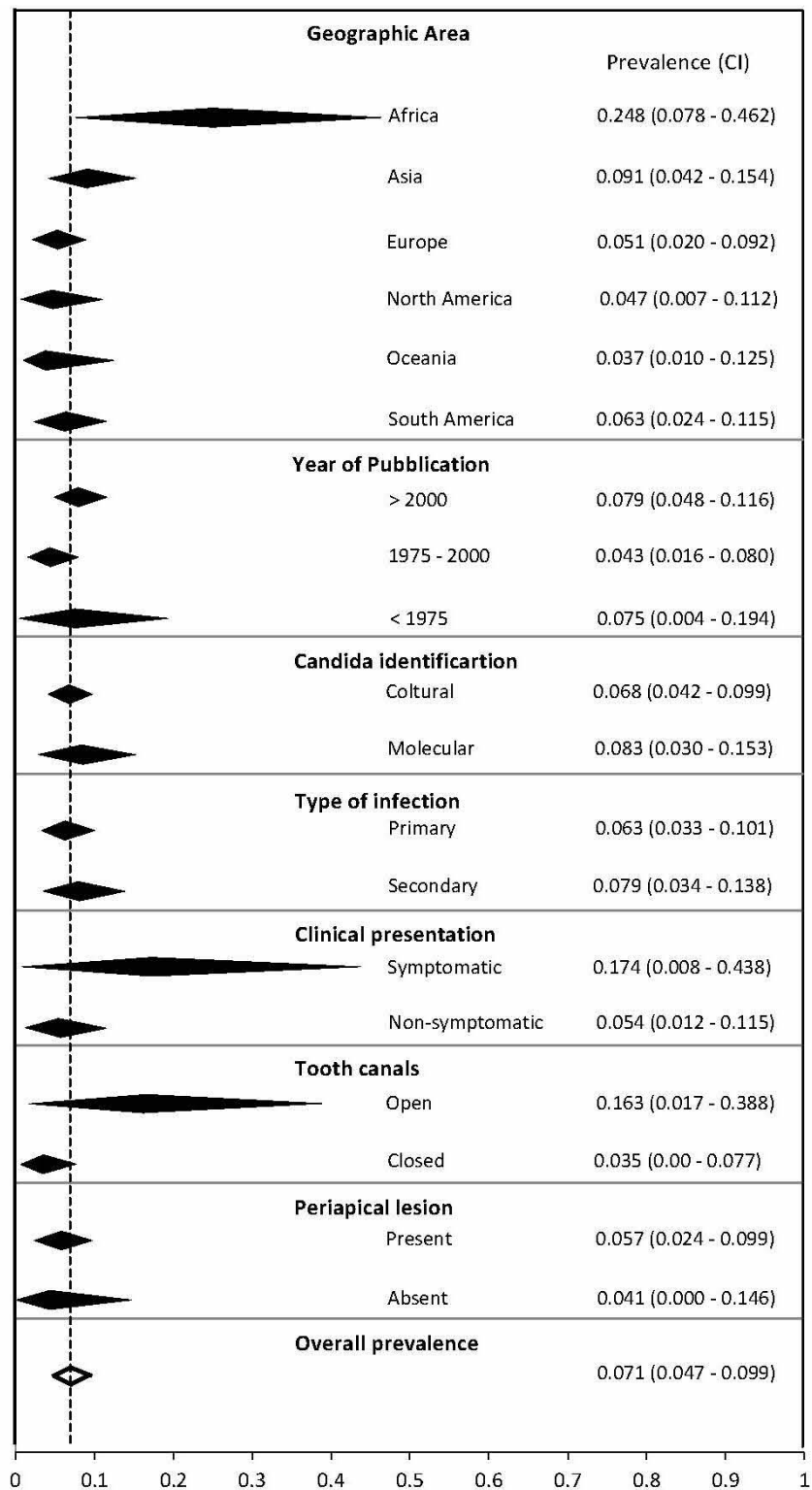


Figura 15 – Prevalenza di *Candida* spp. nei canali infetti in diversi sottogruppi della popolazione. I rombi rappresentano la prevalenza stimata in ogni gruppo e il rispettivo intervallo di confidenza al 95%. Il rombo vuoto e la linea verticale corrisponde alla prevalenza nella popolazione generale.

Tabella 5. Valutazione del rischio di bias negli studi inclusi.

Studio	Target population	Participant recruitment	Sample size	Subject and setting description	Coverage bias	Classification bias	Measurement bias	Response rate
Crawford 1961 (163)	Incerto	Incerto	Alto	Alto	Incerto	Incerto	Alto	Alto
Möller 1966 (162)	Basso	Incerto	Basso	Basso	Alto	Basso	Incerto	Alto
Möller 1966 (116)	Basso	Incerto	Alto	Alto	Incerto	Basso	Incerto	Alto
Najzar-Fleger 1969 (166)	Incerto	Incerto	Basso	Alto	Incerto	Basso	Incerto	Alto
Tommasi 1969 (142)	Incerto	Incerto	Basso	Alto	Alto	Basso	Incerto	Alto
Kessler 1972 (128)	Basso	Incerto	Alto	Alto	Incerto	Incerto	Incerto	Alto
Petit 1972 (161)	Incerto	Incerto	Alto	Alto	Incerto	Basso	Incerto	Alto
Sundqvist 1976 (141)	Basso	Basso	Alto	Alto	Incerto	Basso	Incerto	Alto
Matusow 1979 (131)	Basso	Incerto	Alto	Basso	Alto	Incerto	Basso	Alto
Ferenczi 1983 (124)	Incerto	Basso	Alto	Incerto	Basso	Incerto	Incerto	Alto
Diaz 1995 (164)	Basso	Alto	Alto	Alto	Basso	Basso	Incerto	Alto
Kubo 1997 (129)	Basso	Incerto	Alto	Alto	Incerto	Basso	Incerto	Alto
Molander 1998 (26)	Basso	Incerto	Basso	Alto	Incerto	Incerto	Incerto	Alto
Sundqvist 1998 (27)	Incerto	Alto	Alto	Alto	Incerto	Incerto	Incerto	Alto
Molander 1999 (133)	Basso	Incerto	Alto	Alto	Incerto	Basso	Incerto	Alto
Baumgartner 2000 (117)	Incerto	Incerto	Alto	Alto	Incerto	Basso	Incerto	Alto
Hancock 2001 (28)	Basso	Basso	Alto	Alto	Alto	Incerto	Incerto	Alto
Lana 2001 (130)	Incerto	Incerto	Alto	Alto	Incerto	Basso	Incerto	Alto
Peculieni 2001 (150)	Incerto	Incerto	Alto	Alto	Incerto	Basso	Incerto	Alto
Cheung 2001 (147)	Basso	Incerto	Alto	Alto	Incerto	Basso	Incerto	Basso
Egan 2002 (157)	Basso	Basso	Alto	Alto	Incerto	Basso	Incerto	Alto
Pinheiro 2003/1(25)	Basso	Incerto	Alto	Alto	Basso	Incerto	Incerto	Alto
Pinheiro 2003/2(151)	Basso	Incerto	Alto	Alto	Incerto	Basso	Incerto	Alto
Tsang 2003(143)	Incerto	Incerto	Alto	Alto	Incerto	Incerto	Incerto	Alto
Gomes 2004 (159)	Basso	Alto	Alto	Alto	Incerto	Basso	Incerto	Alto
Siqueira 2004 (155)	Basso	Incerto	Alto	Basso	Alto	Basso	Incerto	Alto
Ferrari 2004(126)	Alto	Incerto	Alto	Alto	Basso	Basso	Basso	Alto
Ogude 2015 (136)	Basso	Incerto	Alto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Alto
Chakraborty 2005 (120)	Incerto	Alto	Alto	Alto	Incerto	Basso	Incerto	Incerto
Chu 2005 (121)	Basso	Basso	Alto	Basso	Basso	Basso	Incerto	Basso
Ferrari 2005(125)	Basso	Basso	Alto	Alto	Basso	Basso	Basso	Basso
Zbidi 2005 (167)	Basso	Incerto	Alto	Alto	Alto	Incerto	Incerto	Alto
Waltimo 2005 (144)	Incerto	Incerto	Alto	Alto	Incerto	Incerto	Incerto	Alto
Erçan 2006 (158)	Basso	Basso	Alto	Alto	Incerto	Basso	Incerto	Incerto
Ashraf 2007 (146)	Basso	Basso	Alto	Alto	Basso	Basso	Incerto	Alto
Cogulu 2008 (122)	Alto	Incerto	Alto	Basso	Alto	Basso	Incerto	Alto
Rocas 2008 (154)	Basso	Alto	Alto	Basso	Alto	Basso	Incerto	Alto
Miranda 2009 (132)	Basso	Incerto	Basso	Basso	Alto	Basso	Incerto	Basso

Mindere 2010 (149)	Incerto	Alto	Alto	Alto	Incerto	Basso	Basso	Alto
Baumotte 2011 (118)	Alto	Basso	Alto	Alto	Basso	Basso	Incerto	Alto
Nastri 2011 (134)	Basso	Incerto	Alto	Basso	Alto	Basso	Incerto	Alto
Rocas 2011 (139)	Incerto	Basso	Alto	Alto	Incerto	Basso	Incerto	Basso
Rocas 2011 (140)	Incerto	Incerto	Alto	Alto	Incerto	Basso	Incerto	Alto
Anderson 2012 (145)	Basso	Incerto	Alto	Alto	Basso	Basso	Incerto	Basso
Brito 2012 (119)	Alto	Basso	Alto	Basso	Basso	Basso	Incerto	Alto
Dumani 2012 (156)	Basso	Alto	Basso	Basso	Basso	Basso	Incerto	Alto
Paiva 2012 (137)	Basso	Basso	Alto	Alto	Basso	Basso	Basso	Basso
Pupo Marrugo 2012(138)	Incerto	Incerto	Alto	Alto	Incerto	Basso	Incerto	Alto
Poptani 2013 (152)	Basso	Incerto	Alto	Basso	Alto	Basso	Incerto	Alto
Kaur 2014 (127)	Alto	Incerto	Alto	Alto	Incerto	Basso	Incerto	Alto
Karygianni 2015(148)	Basso	Incerto	Alto	Alto	Incerto	Basso	Incerto	Alto
Lysakowska 2016 (160)	Basso	Basso	Alto	Basso	Basso	Basso	Basso	Basso
Ndiaye 2016 (135)	Basso	Basso	Alto	Basso	Basso	Basso	Alto	Alto
Persoon 2017 (108)	Basso	Basso	Alto	Alto	Incerto	Basso	Incerto	Alto
Gomes 2017(165)	Alto	Incerto	Alto	Basso	Basso	Basso	Incerto	Alto
Pourhajibagher 2017 (153)	Incerto	Incerto	Alto	Alto	Incerto	Basso	Incerto	Alto
De Miranda 2017 (123)	Basso	Basso	Alto	Basso	Alto	Basso	Basso	Low

Prevalenza di *Candida* spp. nelle infezioni endodontiche



Figura 16 - Valutazione riassuntiva del rischio di bias.

La Figura 17 mostra il funnel plot della prevalenza stimata rispetto l'errore standard. La linea verticale continua corrisponde alla prevalenza della popolazione, le due linee tratteggiate diagonali rappresentano l'intervallo di confidenza al 95% attorno alla prevalenza stimata per ogni errore standard sull'asse verticale, la linea rossa rappresenta la linea di regressione ottenuta con il standard regression test for small-study effects. Il test di Egger è risultato non significativo ($P = 0,175$).

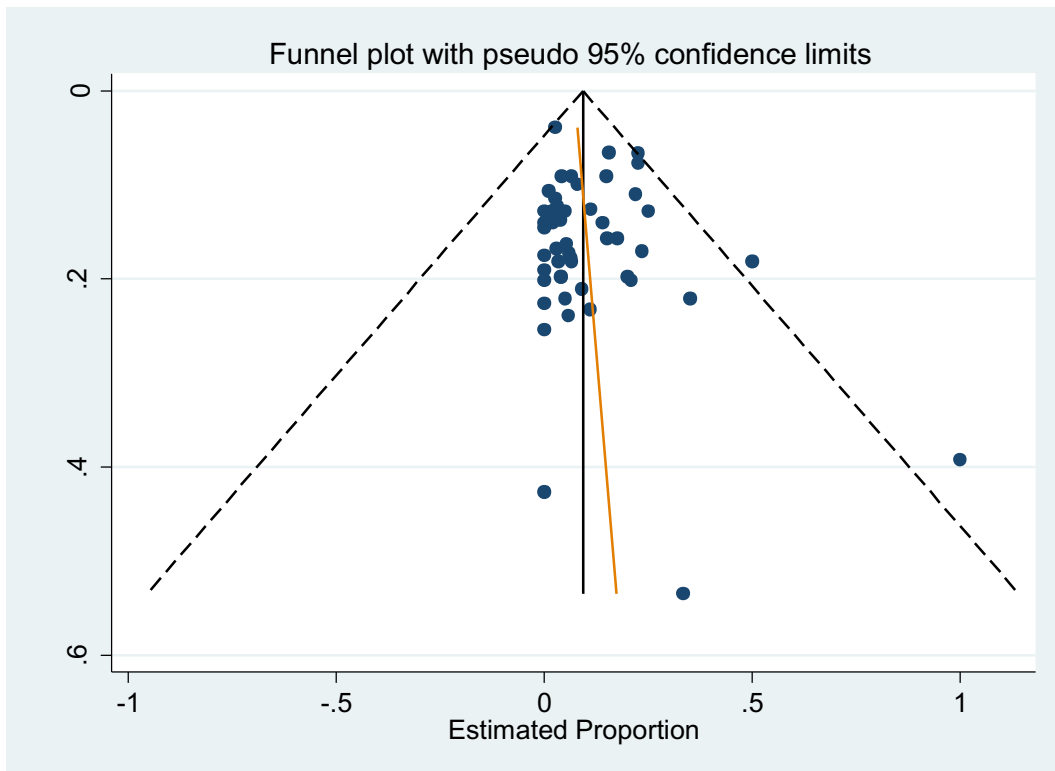


Figura 17 - Funnel plot della proporzione stimata rispetto il suo errore standard. La linea verticale nera corrisponde alla prevalenza combinata, le due linee diagonali corrispondono ai limiti dell'intervallo di confidenza al 95%, la linea rossa rappresenta la linea di regressione ottenuta dal test di Egger.

Discussione

Per decenni la microbiologia endodontica si è focalizzata sul ruolo dei batteri nelle patologie endodontiche, ma recentemente la ricerca ha mostrato un crescente interesse per microrganismi appartenenti a regni diversi, come archeobatteri, virus e funghi (217). Nel regno dei funghi, le specie appartenenti al genere *Candida* possiedono le caratteristiche per essere potenziali patogeni endodontici. Un aspetto fondamentale per stabilire la relazione causale fra un dato microrganismo e una determinata patologia infettiva è l'associazione, cioè il sospetto patogeno deve essere riscontrato più frequentemente e in maggior numero nei casi di infezione rispetto ad individui senza la malattia conclamata o con forme diverse di malattia. In teoria, nelle infezioni endodontiche, qualsiasi specie che colonizza la polpa necrotica può partecipare allo sviluppo della malattia periradicolare. Tuttavia, sembra che non tutte le specie presenti nelle infezioni endodontiche siano in grado di causare la patologia (17). Gli studi microbiologici che hanno indagato la flora batterica dei canali infetti hanno riportato che un set ristretto di specie è più frequente in diverse forme di patologie periradicolari, suggerendo un ruolo patogenetico per alcuni batteri (196). In letteratura vi sono dati contrastanti circa l'associazione fra le specie fungine e le infezioni endodontiche. In questo studio la prevalenza cumulativa di *Candida* spp. è stata di 8,20% (C.I.: 5,56-11,21%), che rappresenta una percentuale abbastanza bassa che pone dubbi concreti sul ruolo di questi miceti come patogeni nella maggior parte delle infezioni endodontiche. Nonostante ciò, *Candida* potrebbe rivestire un ruolo in alcuni casi di patologie endodontiche, sebbene l'evidenza disponibile non sia forte. Come previsto, fra le specie di *Candida*, *C. albicans* è stata la più prevalente e la sua presenza era riportata nei due terzi degli studi. Occorre però specificare che molti studi molecolari utilizzavano primers specifici per *C. albicans*, rendendo di fatto impossibile l'identificazione di altre specie di *Candida*. La seconda specie più frequente è stata *C. tropicalis* e ciò riflette, probabilmente, il fatto che *C. tropicalis* sia la più comune specie di *Candida* non-*albicans* riscontrata nel cavo orale, sia di soggetti sani che diabetici (218, 219).

E' stata osservata una grande eterogeneità fra gli studi, limitando di fatto l'affidabilità dei risultati.

L'analisi dei sottogruppi è stata effettuata nel tentativo di spiegare quella parte di variabilità non dovuta al caso. In questa analisi è stata analizzata la possibile influenza di variabili cliniche e metodologiche sulla prevalenza di *Candida*. Fra le variabili considerate, solo l'area geografica di provenienza è risultata significativa: gli studi provenienti dal continente africano presentavano infatti una prevalenza cumulativa maggiore (24.82%) rispetto gli studi provenienti dall'Asia, dall'America del Nord e dall'America del Sud America (rispettivamente del 10.56%, 4.62%, 4.67%, 8.57%). Una possibile spiegazione di questa differenza può essere dovuta la basso numero di studi provenienti dall'Africa (n = 4), fra cui uno con un numero di denti analizzati molto ristretto (n = 3) (128). Inoltre, la valutazione del rischio di bias suggerisce che le modalità con cui è sono stati condotti gli studi potrebbe aver determinato una sovrastima della prevalenza di *Candida* spp. Infatti, ad esclusione dello studio di Ndiaye et al. (135), gli altri tre studi (128, 136, 167) provenienti dal continente africano mostravano un rischio di bias basso solo per uno degli 8 items considerati. Per gli altri items il rischio di bias era alto o incerto. Nonostante queste considerazioni, l'ipotesi di una effettiva influenza geografica nella composizione del microbiota di canali infetti non può essere scartata a priori. Infatti, alcuni studi condotti in passato per confrontare con tecniche molecolari il microbiota endodontico di pazienti provenienti da diverse aree geografiche hanno evidenziato differenze significative sulla prevalenza di alcune importanti specie (220-222).

Gli altri fattori considerati nell'analisi dei sottogruppi – periodo di pubblicazione, tecnica di identificazione e variabili cliniche (tipo di infezione, presenza di sintomi, presenza di lesione radiologica periapicale, comunicazione diretta dei canali nella cavità orale) – non erano associati a differenze statisticamente significative nella prevalenza di *Candida*. In particolare, non è stata riscontrata una prevalenza di funghi significativamente più alta nelle infezioni endodontiche secondarie rispetto le primarie, come invece riportato in altri studi (45, 146, 156). Allo stesso modo, le differenti condizioni ambientali (tensione di O₂ e CO₂, pH, disponibilità di nutrienti) dei canali chiusi o in comunicazione con il cavo orale non sembrano modificare la prevalenza di *Candida* spp. La possibile influenza del bias di pubblicazione è risultata irrilevante (test di l'Egger non

significativo). La grande eterogeneità nei risultati può essere una conseguenza di possibili bias degli studi. Il rischio di bias è risultato alto o incerto per molti degli items considerati. Idealmente uno studio che si ponesse come obiettivo quello di calcolare la prevalenza di *Candida* spp. nelle infezioni endodontiche di una data popolazione dovrebbe arruolare, da un setting rappresentativo come i soggetti afferenti ad un ordinario studio odontoiatrico, un adeguato numero di pazienti non selezionati e dichiarare in modo chiaro i criteri di inclusione ed esclusione. Inoltre le informazioni riguardanti l'età e il sesso dei soggetti, come anche il tipo di infezione endodontica, dovrebbero essere riportati in modo da rendere i risultati paragonabili con altri studi. Dovrebbero essere seguite adeguate procedure per evitare la contaminazione dei campioni in modo tale che solo un piccolo numero venga scartato a causa del mancato superamento dei controlli di sterilità. I campioni, prelevati dallo stesso operatore, dovrebbero essere processati con tecniche validate. Purtroppo non esiste ancora uno studio che soddisfi tutte queste caratteristiche. Recentemente, Persoon et al. hanno pubblicato una revisione sistematica sulla prevalenza di funghi in canali radicolari infetti (9). Abbiamo deciso di limitare il nostro campo di ricerca a *Candida*, essendo questo il genere del regno dei funghi più rilevante nel cavo orale. Sebbene la presente revisione mostri molti aspetti simili allo studio di Persoon et al., esistono alcune rilevanti differenze. Mentre Persoon et al. considerano l'intero regno dei funghi, nel nostro lavoro abbiamo ristretto la ricerca alle specie di *Candida* e, di conseguenza, la strategia di ricerca e i criteri di inclusione/esclusione sono diversi. In particolare in questa revisione gli studi che rilevavano la presenza di funghi mediante analisi morfologica microscopica sono stati esclusi. A livello metodologico, le banche dati interrogate non erano le stesse, e, a livello di spazio temporale, la nostra ricerca ha incluso anche studi più recenti. Vi sono state pertanto differenze negli articoli selezionati per la meta-analisi, inoltre, per alcuni studi inclusi in entrambe le selezioni, i dati estratti presentano alcune differenze. Infine sono stati adottati metodi diversi per il calcolo della prevalenza cumulative. Il calcolo infatti è stato condotto seguendo il modello del random effect perché è stata anticipata una ampia eterogeneità, che è stata poi successivamente confermata. Persoon et al. hanno invece stimato la prevalenza cumulativa usando il metodo del fixed effect, giustificando questa scelta

con il basso rischio di sovrastimare la reale prevalenza. Il dibattito sulla superiorità di un metodo rispetto l'altro è ancora aperta (223). In questo studio il metodo del random effect è stato scelto perchè raccomandato in libri sulla meta-analisi (224), in statements di esperti (225) e perchè è ampiamente adottato nella letteratura medica.

Nonostante queste differenze, la prevalenza combinata è risultata simile nei due studi (7.5% vs 8.2%), suggerendo che i valori riportati probabilmente non sono lontani dalla reale prevalenza di funghi nelle infezioni endodontiche.

In conclusione, *Candida* spp. sono presenti in una piccola percentuale di infezioni endodontiche, con alcune differenze geografiche, anche se l'evidenza è bassa. Ulteriori ricerche in questo campo sono necessarie per indagare il reale contributo di *Candida* spp. nell'ecologia dei canali infetti e per valutare la necessità di implementare le terapie endodontiche con misure specifiche contro i funghi.

Effetto antibatterico di due peptidi sintetici di derivazione anticorpale nei confronti del patogeno endodontico *Enterococcus faecalis*

Riassunto

Le tecniche tradizionali di disinfezione endodontica non sono in grado di eliminare completamente i microrganismi del sistema canalare. Si rende pertanto necessario lo sviluppo di nuovi agenti antimicrobici efficaci nell'inibizione della microflora endodontica. Lo scopo di questo studio è la valutazione *in vitro* delle proprietà antibatteriche di KP e L18R, due peptidi sintetici di derivazione anticorpale, nei confronti di un ceppo di riferimento di *Enterococcus faecalis*. L'attività battericida dei peptidi nei confronti di *E. faecalis* ATCC 29212 allo stato planctonico è stata valutata mediante saggi convenzionali di determinazione di unità formanti colonia, stabilendo la concentrazione in grado di inibire il 50% della crescita batterica (EC₅₀). L'effetto dei peptidi sulla riduzione della massa e della vitalità del biofilm è stato valutato mediante saggi con Crystal Violet e Alamar Blue. Mediante microscopia confocale a scansione laser (MCSL) e microscopia elettronica a scansione (SEM) è stato valutato l'effetto di KP, L18R e di una soluzione satura di Ca(OH)₂ in un modello sperimentale di infezione endodontica costituito da biofilm di *E. faecalis* cresciuti su dischetti di idrossiapatite. KP e L18R hanno mostrato un'efficace attività battericida nei confronti di *E. faecalis* allo stato planctonico e L18R si è mostrato 10 volte più efficace rispetto a KP (valori di EC₅₀ rispettivamente di 4.520×10^{-6} M e 3.624×10^{-7} M). Entrambi i peptidi sono stati in grado di inibire *in vitro* sia la crescita che l'attività metabolica di biofilm di *E. faecalis* con un effetto dose-dipendente. Le immagini di MCSL e di SEM hanno mostrato che i peptidi erano in grado di alterare la vitalità e la conformazione dei biofilm anche nel modello di infezione endodontica analizzato. La valutazione quantitativa delle ricostruzioni 3D ottenute mediante MCSL ha mostrato una maggiore efficacia di L18R rispetto a KP e Ca(OH)₂. L'esposizione per 24 ore ai peptidi fino a concentrazioni pari a 400 µg/ml non ha determinato effetti tossici nei confronti di fibroblasti L929. I risultati ottenuti mostrano che i peptidi antimicrobici possono rappresentare una promettente strategia per il controllo delle infezioni

endodontiche.

Background

L'obiettivo del trattamento endodontico è quello di risolvere o prevenire la periodontite apicale eliminando i microrganismi dal sistema canalare. Purtroppo le procedure chemo-meccaniche di decontaminazione canalare attualmente disponibili sono insufficienti per assicurare completa eradicazione dei microrganismi (10, 11) e il posizionamento di medicazioni intermedie risulta spesso indicato (226). Fra queste, l'idrossido di calcio - Ca(OH)_2 - è quella più utilizzata. Le proprietà antimicrobiche di Ca(OH)_2 dipendono dal rilascio e dalla diffusione di ioni idrossile (OH^-) determinando un ambiente fortemente alcalino che inibisce la crescita di molti patogeni endodontici (227). Nelle condizioni cliniche l'attività di Ca(OH)_2 è contrastata dal potere tampone della dentina (228). Inoltre, *E. faecalis*, un batterio anaerobio facoltativo Gram-positivo riscontrato frequentemente nei fallimenti endodontici, ha dimostrato di possedere una relativa resistenza all'azione di Ca(OH)_2 (229, 230). Una delle strategie adottate da *E. faecalis* per resistere agli agenti antimicrobici è la formazione di biofilm sulle superfici del lume canalare, da solo o in combinazione con altre specie batteriche (35). I biofilm sono organizzazioni complesse di cellule batteriche che crescono su una superficie solida immerse in una matrice polisaccaridica extracellulare. Queste strutture rendono i microrganismi in esse contenute estremamente difficili da eradicare rispetto alle stesse cellule in forma planctonica. Date queste premesse, l'introduzione di nuovi agenti efficaci nei confronti dei biofilm potrebbe determinare dei vantaggi nel successo del trattamento endodontico. I peptidi antimicrobici sono un gruppo di corte molecole peptidiche a basso peso molecolare che possiedono un'attività antimicrobica ad ampio spettro, proprietà immunomodulanti e una scarsa propensione ad indurre resistenze (231). Il loro meccanismo d'azione non è stato ancora del tutto compreso, ma per molti di essi sembra essere mediato da un danno alla membrana cellulare che conduce poi alla morte del microrganismo (232). I peptidi antimicrobici hanno suscitato grande interesse nella comunità scientifica rappresentando una potenziale risposta al drammatico problema delle resistenze

antibiotiche. I peptidi antimicrobici possono essere distinti in naturali o sintetici. I primi sono prodotti dalla maggior parte degli organismi viventi, inclusi mammiferi, insetti, batteri e funghi e rappresentano una componente del loro sistema immunitario innato. Esempi di peptidi naturali sono la nisina, sintetizzata da *Lactobacillus lactis* (233) e la catelicidina LL-37, espressa dai neutrofili umani e dai tessuti epiteliali (234). Accanto ai peptidi naturali, è stata creata un'ampia gamma di peptidi sintetici con l'obiettivo di implementare le proprietà antimicrobiche, ottimizzare le proprietà farmacocinetiche e ridurre i costi di produzione. Fra questi, due peptidi recentemente descritti con il nome di KP e L18R hanno mostrato promettenti capacità antimicrobiche. Il peptide killer KP (AKVTMTCSAS, peso molecolare = 998.2, punto isoelettrico = 8.2) è un decapeptide derivato dalla sequenza della regione variabile di un anticorpo ricombinante anti-idiotipo a singola catena, che rappresenta funzionalmente l'immagine interna di una tossina prodotta da *Pichia anomala* (ora *Wickerhamomyces anomalus*) (235). KP ha dimostrato effetti antimicrobici *in vitro*, *ex vivo* e/o *in vivo* contro numerosi patogeni tassonomicamente lontani, inclusi batteri, protozoi, alghe e funghi (60). Studi dell'attività antifungina di KP su *C. albicans* hanno mostrato la comparsa di gravi alterazioni, come il rigonfiamento della parete cellulare, il collasso della membrana plasmatica, la condensazione della cromatina e la frammentazione nucleare (236); si pensa che questi effetti siano il risultato di un'interazione del peptide con i β -1,3-glucani della parete cellulare fungina. Tuttavia, il preciso meccanismo dell'attività di KP deve ancora essere completamente chiarito (60). Recentemente, studi condotti sugli effetti di KP sulla produzione di biofilm in *C. albicans* hanno evidenziato che esso è in grado di ridurre significativamente la biomassa e l'attività metabolica del biofilm sia maturo che in fase di formazione, con un incremento della risposta allo stress ossidativo e della permeabilità della membrana delle cellule fungine. Anche l'espressione genica che regola la formazione di biofilm è stata significativamente ridotta. Tutto ciò ha portato a considerare KP come un valido candidato per il trattamento e la prevenzione delle infezioni fungine da *C. albicans* correlate al biofilm (235). KP agisce *in vitro* anche nei confronti di batteri Gram-positivi e Gram-negativi, ad esempio nei confronti di specie di *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leptospira*, enterobatteri, nonché *P.*

aeruginosa e *M. tuberculosis*, compresi ceppi multiresistenti (60). Altrettanto rilevante è l'attività antivirale di KP nei confronti di HIV e virus influenzali (237, 238) e quella anti-protozoaria nei confronti di importanti patogeni umani, quali *Acanthamoeba*, *Leishmania* e *Toxoplasma* (239-241). Non esistono dati pubblicati circa l'effetto antibatterico di KP nei confronti di *E. faecalis*.

L18R (LLVLRSLGPWHPGHCLLR, peso molecolare = 2.068,1, punto isoelettrico = 10,35) è un peptide sintetico derivato dal locus genico *heavy* (H) di un gene (IGHJ2) appartenente alla famiglia delle immunoglobuline umane (242). Questo peptide ha dimostrato un'attività fungicida diretta *in vitro*, a concentrazioni micromolari, nei confronti di diverse specie di lieviti, quali *C. albicans*, *C. glabrata*, *Cryptococcus neoformans* e *Malassezia furfur*, compresi ceppi di *C. albicans* resistenti ai convenzionali farmaci antifungini (242). L18R si è dimostrato significativamente molto attivo, inducendo la morte per apoptosi di cellule di *C. albicans* trattate con il peptide (242). Il meccanismo d'azione è di tipo ATP-indipendente, con destabilizzazione della membrana a cui si associa il folding del peptide; l'internalizzazione del peptide dipende dalla sua concentrazione e dalla composizione della membrana stessa (242). Le principali alterazioni osservate mediante microscopia elettronica a trasmissione in cellule di *C. albicans* trattate con L18R sono state la presenza di microsomi (perossisomi) e la retrazione della membrana plasmatica associata ad alterazioni della parete cellulare. Questo perché il peptide sulla membrana plasmatica può generare dei precursori che svolgono un ruolo importante nella formazione dei microsomi, i quali possono contenere catalasi, ROS e altri enzimi; la retrazione della membrana e le alterazioni della parete cellulare probabilmente riflettono gli effetti del peptide sul citoscheletro, sui filamenti di actina e su altre strutture, che possono portare a disfunzione mitocondriale (242).

L'obiettivo di questo studio è valutare le proprietà antibatteriche di KP e L18R nei confronti di *Enterococcus faecalis* in forma di cellule planctoniche e di biofilm e di verificare la loro citotossicità nei confronti di cellule eucariotiche.

Materiali e metodi

Ceppo batterico

Per gli esperimenti è stato utilizzato un ceppo di isolamento clinico, di riferimento, proveniente dalla collezione American Type Culture Collection (ATCC), *E. faecalis* ATCC 29212.

Terreni di coltura e tamponi

I terreni utilizzati per la batteriologia sono stati:

- Brain Heart Infusion Agar (BHIA): seguendo le indicazioni del produttore (Fluka, Sigma-Aldrich), 52 g di polvere sono stati sciolti in 1 litro di acqua demineralizzata, portati a pH 7.4 e sterilizzati in autoclave (a 121°C per 15 minuti). Il terreno è stato successivamente distribuito in piastre di Petri (15 ml/per piastra).
- Brain Heart Infusion Broth (BHIB): 37 g di polvere sono stati sciolti in 1 litro di acqua demineralizzata, secondo le indicazioni del produttore (Fluka, Sigma-Aldrich), portati a pH 7.4 e sterilizzati in autoclave (a una temperatura di 121°C per 15 minuti).

Per le colture cellulari è stato utilizzato il seguente terreno:

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma-Aldrich), addizionato con 10% di siero bovino fetale scomplementato (FBS), penicillina (100 U/ml) e streptomicina (100 µg/ml).

Tamponi:

- Tampone fosfato salino (PBS): 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na₂HPO₄, 0,259 g KH₂PO₄ sono stati dissolti in 1 litro di acqua distillata, portati a pH 7,4 e sterilizzati per filtrazione o in autoclave a 121°C per 15 minuti.

Mantenimento in coltura di cellule murine immortalizzate

Cellule murine di derivazione fibroblastica L929 sono state mantenute in coltura, in DMEM/FBS, all'interno di fiasche sterili da 25 cm² a 37°C in un incubatore umidificato con 5% di CO₂, eseguendo

subcolture al momento del raggiungimento della confluenza.

Peptidi KP e L18R

I peptidi KP e L18R sono stati sintetizzati chimicamente presso il Servizio di Sintesi Peptidi del Centro di Ricerca Interdipartimentale Biotecnologie Innovative (CRIBI) dell'Università degli Studi di Padova. Sono quindi stati solubilizzati in dimetilsolfossido (DMSO, Sigma-Aldrich) alla concentrazione iniziale di 20 mg/ml e successivamente diluiti in acqua alla concentrazione di 2 mg/ml.

Dischetti di idrossiapatite (HA)

Per ricreare una superficie più simile alla dentina rispetto alla plastica delle piastre per microtitolazione, sono stati utilizzati dei dischetti di HA. L'utilizzo di dischetti di HA è riportato da altri autori per studiare i biofilm orali (94, 97, 99). I dischetti di HA sono stati gentilmente forniti dal dott. Giuseppe Lagori. Il protocollo per la loro realizzazione è descritto in un suo precedente studio (243). Brevemente, 0,150 g di polvere di HA (Sigma Aldrich, USA) sono stati compressi alla pressione di 50 bar in stampi circolari di 12,9 mm di diametro mediante una pressa idraulica (Eurocem EPI 1, Italy). I dischetti così ottenuti sono stati portati alla temperatura di 980°C sotto vuoto in un forno per ceramiche dentali (Multimat Mach 3 Dentsply, Germany). I dischetti presentavano mediamente un diametro di 10.21 ± 0.15 mm, uno spessore di 1.422 ± 0.22 mm e una densità di 2.78 ± 0.18 g/cm³ (Figura 18)

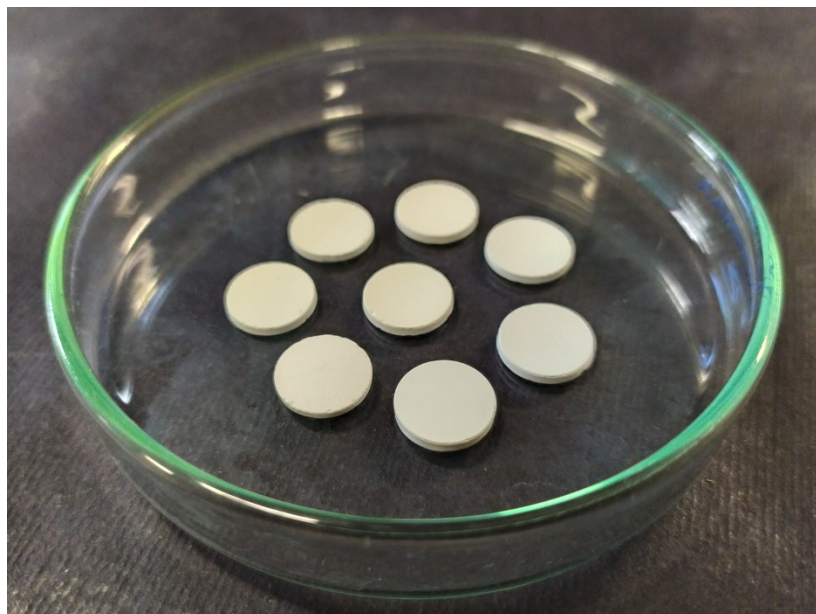


Figura 18 - I dischetti di HA usati per la crescita del biofilm di *E. faecalis*.

Idrossido di calcio

Per confrontare l'effetto antibiofilm dei peptidi è stata scelta una sostanza comunemente utilizzata in campo endodontico come medicazione intermedia, l'idrossido di calcio. È stata preparata una soluzione satura di Ca(OH)_2 miscelando 38 mg di Calxyl (OCO, GmbH) in 10 ml di acqua distillata sterile. La miscela è stata centrifugata a 3000 RPM per 15 minuti. Il supernatante acquoso è stato filtrato utilizzando un filtro da siringa 0,22 sterile (Millex, Merck Millipore).

Valutazione dell'attività citotossica in vitro nei confronti di fibroblasti L929

Le cellule L929 a confluenza sono state lavate 3 volte con PBS e incubate con 0,5 ml di tripsina (Sigma-Aldrich) per 3 minuti a 37°C. Dopo aver verificato al microscopio il distacco completo delle cellule, è stato aggiunto DMEM fresco al fine di neutralizzare l'attività enzimatica. Un'aliquota di cellule, prima della conta eseguita al microscopio mediante emocitometro, è stata diluita in rapporto 1:1 in Trypan blue, un colorante vitale che penetra nelle cellule morte. Le cellule sono state portate alla concentrazione di 4×10^5 cell/ml, e poi seminate (100 μl /pozzetto) in una piastra per microtitolazione in polistirene da 96 pozzetti a fondo piatto e incubate a 37°C per 24 ore (h). Per valutare l'attività citotossica, sono stati aggiunti KP e L18R in DMEM (100 μl /pozzetto), a

concentrazioni crescenti (50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml); nel controllo negativo è stato aggiunto DMEM. Dopo incubazione a 37°C per 24 h, è stato effettuato il test di vitalità utilizzando MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), un composto che viene ridotto dal metabolismo cellulare portando alla formazione di cristalli blu insolubili in acqua. Dopo risospensione dei cristalli in un tampone opportuno, è stato possibile stimare il numero di cellule vive presenti in coltura mediante saggio spettrofotometrico. Dopo avere rimosso i peptidi, le cellule presenti in ogni pozzetto sono state incubate con 100 µl di una soluzione di MTT alla concentrazione di 0,5 mg/ml in DMEM per 4 h a 37°C. I cristalli formati sono stati solubilizzati attraverso una soluzione composta da 10% Triton-X-100 e 0,1% HCl in isopropanolo (100 µl/pozzetto). Dopo incubazione per una notte (overnight, ON), è stata misurata l'assorbanza a 540 nm, quantificando la vitalità cellulare come percentuale di crescita comparativamente ai controlli non trattati. I risultati rappresentano la media di due esperimenti indipendenti eseguiti in triplo a scopo statistico.

Valutazione dell'attività di KP e L18R nei confronti di cellule di E. faecalis in stato planctonico

Con lo scopo di indagare l'attività battericida di KP e L18R, sono stati eseguiti dei saggi di unità formanti colonia (UFC). *E. faecalis* ATCC 29212 è stato coltivato in piastre di Petri su BHIA a 37°C per 24 h. Successivamente, sono state prelevate dalla piastra alcune colonie e inoculate in 2 ml di soluzione fisiologica, fino a ottenere una torbidità di 0,5 McFarland, corrispondente a $1,5 \times 10^8$ cellule/ml. Questa sospensione batterica è stata prima diluita 1:800 in BHIB e poi 1:20 in acqua per la preparazione dell'inoculo finale. Per l'esecuzione del saggio sono state utilizzate piastre per microtitolazione da 96 pozzetti a fondo concavo. In ciascun pozzetto sono stati trasferiti 10 µl di sospensione batterica, in assenza (controlli di crescita) o in presenza di concentrazioni scalari dei peptidi in esame, in un volume finale di 100 µl/pozzetto.

Dopo incubazione per 5 h a 37°C, l'intero contenuto dei singoli pozzetti è stato seminato sulla superficie di piastre di Petri contenenti BHIA. Dopo incubazione per 24 h a 37°C è stata effettuata la conta del numero di UFC.

Tutti i saggi sono stati realizzati in triplo a scopo statistico. Le percentuali di inibizione della crescita sono state calcolate con la seguente formula:

$$\text{inibizione della crescita (\%)} = 100 - \frac{N^{\circ}\text{UFC in presenza di peptide}}{N^{\circ}\text{UFC nel controllo crescita}} \times 100$$

I risultati ottenuti sono stati utilizzati per calcolare il valore di EC₅₀, ovvero la concentrazione di peptide in grado di uccidere il 50% delle cellule saggiate, mediante analisi di regressione non lineare utilizzando il programma GraphPad Prism 4.01 (San Diego, CA USA).

Valutazione dell'attività di KP e L18R nei confronti di biofilms di E. faecalis

Lo studio degli effetti dei peptidi nei confronti di biofilm batterici è stato eseguito a partire da una sospensione batterica di *E. faecalis* ATCC 29212 incubata ON in BHIB, arricchito con 0.25% di glucosio (BHIBg). Successivamente, la sospensione è stata diluita 1:20 in terreno fresco e trasferita (200 µl/pozzetto) in piastre di polistirene per microtitolazione da 96 pozzetti a fondo piatto. Dopo aver lasciato aderire i microrganismi in incubazione a 37°C per 90 minuti, è stato effettuato un lavaggio con acqua per rimuovere le cellule batteriche ancora in sospensione. Sono state poi aggiunte, in triplo, concentrazioni crescenti di peptide in acqua, fino a un volume totale di 200 µl/pozzetto. I pozzetti non trattati sono stati utilizzati come controlli di crescita. Dopo 5 h a 37°C è stato effettuato un lavaggio con acqua e poi sono stati aggiunti 200 µl/pozzetto di BHIBg fresco. Le piastre sono state quindi incubate a 37°C per 48 h, prima di effettuare saggi per la quantificazione della biomassa e dell'attività metabolica del biofilm. La massa del biofilm batterico è stata valutata mediante saggio con Crystal Violet (CV, Sigma-Aldrich). I pozzetti sono stati lavati con acqua sterile (3 lavaggi con 200 µl/pozzetto), poi le piastre sono state asciugate in stufa a 80°C per 15 minuti e colorate con CV (200 µl/pozzetto) precedentemente diluito con acqua demineralizzata alla concentrazione di lavoro 0,25%. Il CV è stato lasciato agire per 15 minuti, quindi sono stati eseguiti 3 lavaggi (200 µl/pozzetto) con acqua sterile in modo tale da eliminare l'eccesso di colorante. Successivamente, le piastre sono state lasciate ON al buio a temperatura ambiente. Il giorno seguente, per procedere alla lettura dei risultati, è stato aggiunto etanolo all'85% in ciascun pozzetto (200 µl/pozzetto) e misurata

l'assorbanza a 540 nm. L'attività metabolica del biofilm è stata valutata mediante saggio con Alamar Blue (CellTiter-Blue, Invitrogen, DAL1100), un colorante vitale il cui meccanismo si basa sulla riduzione della molecola resazurina a resofurina fluorescente da parte delle cellule batteriche metabolicamente attive. I pozzetti sono stati svuotati e lavati per 3 volte con acqua sterile (200 µl/pozzetto). Per ottimizzare la lettura al fluorimetro è stata applicata una pellicola nera sul retro della piastra. È stato quindi aggiunto Alamar Blue (200 µl/pozzetto) e successivamente le piastre sono state incubate per 1 h a 37°C. L'intensità di fluorescenza è stata misurata utilizzando un fluorimetro (EnSpire® Multimode Plate Reader, PerkinElmer), settando l'eccitazione a 570 nm e l'emissione a 585 nm. I risultati sono stati espressi come percentuale di riduzione della massa di biofilm e dell'attività metabolica rispetto ai controlli di crescita. I dati ottenuti sono stati utilizzati per calcolare l'EC₅₀ di KP e di L18R, come precedentemente descritto.

Valutazione dell'attività di KP e L18R nei confronti di biofilms di E. faecalis sviluppati su dischetti di HA

Per poter riprodurre più fedelmente lo scenario clinico di un'infezione endodontica, sono stati utilizzati dei dischetti di HA come superficie di crescita per il biofilm di *E. faecalis* ATCC 29212. I dischetti, precedentemente sterilizzati, sono stati posizionati all'interno di piastre da 24 pozzetti a fondo piatto e incubati per 48 h a 37°C in 500 µl di una diluizione (1:20) di una coltura di *E. faecalis* cresciuta ON in BHIBg. Trascorso questo tempo, i pozzetti sono stati svuotati e i dischetti sono stati trattati con acqua sterile (controllo di crescita), con una soluzione satura di Ca(OH)₂, con KP (100 µg/ml) e con L18R (50 µg/ml) per 24 h. Metà dei dischetti sono stati processati per l'analisi al microscopio confocale a scansione laser (MCSL) e l'altra metà per l'analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM).

Microscopia confocale a scansione laser

I biofilm di *E. faecalis* ATCC 29212 cresciuti sui dischetti di HA e sottoposti ai diversi trattamenti sono stati colorati con un kit per la rivelazione della vitalità di cellule in biofilm (FilmTracer™

LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit, Invitrogen, Paisley, UK), secondo il protocollo fornito dal produttore. Il kit si basa sul colorante fluorescente Syto 9, che marca le cellule vive, e su ioduro di propidio, che penetra nelle cellule morte. Ogni dischetto è stato trasferito in un pozzetto contenente una soluzione formata da 1,5 µl di Syto 9, 1,5 µl di ioduro di propidio e 500 µl di acqua sterile. Dopo incubazione al buio a temperatura ambiente per 25 minuti, i dischetti sono stati lavati in acqua e posizionati in opportune celle per l'osservazione al microscopio confocale a scansione laser LSM 510 Meta scan, integrato con un microscopio invertito Axiovert 200 M (Carl Zeiss, Jena, Germania). Le lunghezze d'onda di eccitazione/emissione sono state 480/500 nm per Syto 9 e 490/635 nm per ioduro di propidio. I campioni sono stati osservati usando un obiettivo a immersione a olio 40 × NA1.3. Le Z stacks sono state ottenute dalla porzione più coronale del biofilm fino alla superficie adesa al dischetto, con un intervallo di 0,5 µm fra ogni frame. Per ogni campione sono stati scansionati 4 campi scelti casualmente. Le ricostruzioni 3D sono state realizzate mediante il software sviluppato dal produttore del microscopio (Axiovision module inside 4D release 4.5, Carl Zeiss, Jena, Germany). L'intensità della fluorescenza rossa e verde è stata quantificata con il software Imaris® (versione 9.5, Oxford Instruments Group). È stata calcolata l'intensità percentuale della fluorescenza delle cellule morte (rosso) rispetto all'intensità totale (rosso + verde).

Microscopia elettronica a scansione

I biofilm di *E. faecalis* ATCC 29212 cresciuti sui dischetti di HA e sottoposti ai diversi trattamenti sono stati lavati con acqua sterile e fatti asciugare per 15 minuti a temperatura ambiente. Sono quindi stati ricoperti con 100 µl di una soluzione di glutaraldeide al 4% in buffer sodio cacodilato 0,1 M per 3 minuti (pre-fissazione). I campioni sono stati successivamente fissati su una nuova piastra immergendo i dischetti in glutaraldeide al 4%. I dischetti sono stati lavati in PBS per circa 30 minuti e disidratati con soluzioni alcoliche progressive (25%, 50%, 75%, 90%, 100%). Successivamente, i campioni sono stati lavati in acetone 100% e disidratati mediante Critical point dryer in CO₂ liquida (31,1°C e 72,9 atm). Una volta asciutti, i dischetti sono stati montati su un supporto di alluminio e rivestiti con un film di 60 nm di oro mediante dispositivo metallizzatore (Balzers UNION). I campioni

così allestiti sono stati osservati con un microscopio elettronico a scansione Philips SEM501 registrando immagini a diversi ingrandimenti. Le immagini scansionate a 5000X sono state utilizzate per calcolare l'area percentuale occupata da cellule adese al dischetto, mediante il software NIH ImageJ (versione 1.48).

Analisi statistica

Tutti i risultati sono presentati come media \pm deviazione standard (DS). Le differenze fra i gruppi sono state statisticamente valutate mediante l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test di Tukey's per i confronti multipli (GraphPad Prism 4.01, San Diego, CA USA).

Risultati

Citotossicità di KP e L18R nei confronti di fibroblasti L929

Il saggio di valutazione dell'attività citotossica dei peptidi nei confronti di cellule murine di derivazione fibroblastica ha confermato l'assenza di tossicità dei peptidi stessi, poiché le cellule, anche a concentrazioni crescenti di KP e L18R, sono rimaste vitali (Figura 19).

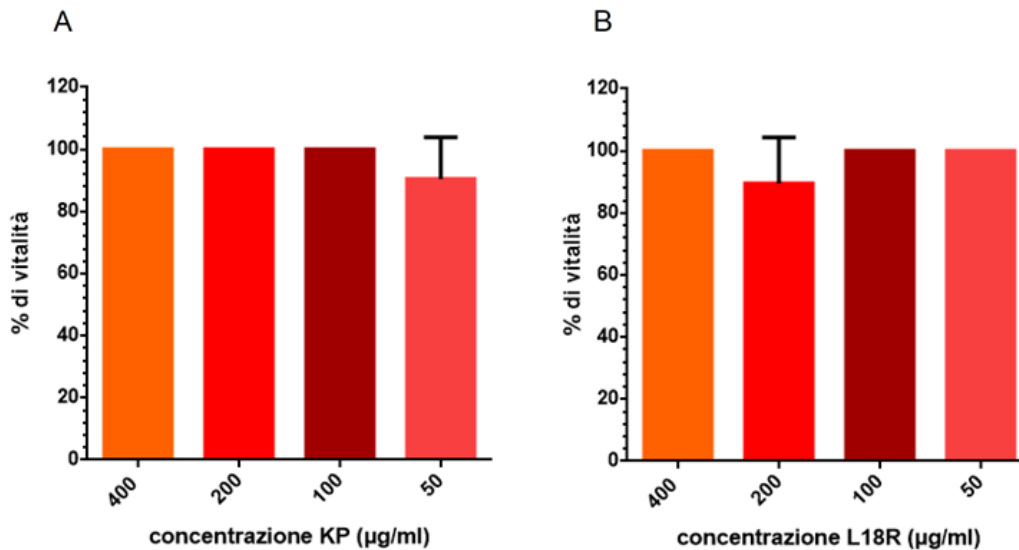


Figura 19 - Effetto delle differenti concentrazioni di peptidi KP (A) e L18R (B) nei confronti di fibroblasti L929 rilevato mediante il test di vitalità con MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). I risultati qui rappresentati sono le medie di due esperimenti indipendenti eseguiti in triplo \pm deviazione standard. Le medie sono state calcolate per ciascuna concentrazione ed espresse come percentuale di vitalità cellulare in rapporto al controllo negativo costituito da cellule non trattate (100% di cellule vive).

Attività di KP e L18R contro E. faecalis in stato planctonico

Entrambi i peptidi hanno dimostrato un'importante attività battericida nei confronti delle cellule di *E. faecalis* ATCC 29212 allo stato planctonico. In particolare, il peptide L18R si è dimostrato 10 volte più efficace rispetto a KP (Tabella 6). In Figura 20 sono riportate immagini rappresentative dei risultati ottenuti nei saggi di UFC.

Tabella 6. Valori di EC50 relativi all'attività battericida *in vitro* dei peptidi KP e L18R nei confronti di *E. faecalis* ATCC 29212 determinata con il test UFC. L'EC₅₀ è la concentrazione in grado di produrre il 50% dell'effetto massimale.

Peptide	Peso molecolare (Da)	EC ₅₀ (mol/l)	Intervallo di confidenza al 95% (mol/l)	
KP	998,17	4,520×10 ⁻⁶	3,035×10 ⁻⁶	6,733×10 ⁻⁶
L18R	2068,1	3,624×10 ⁻⁷	2,767×10 ⁻⁷	4,745×10 ⁻⁷

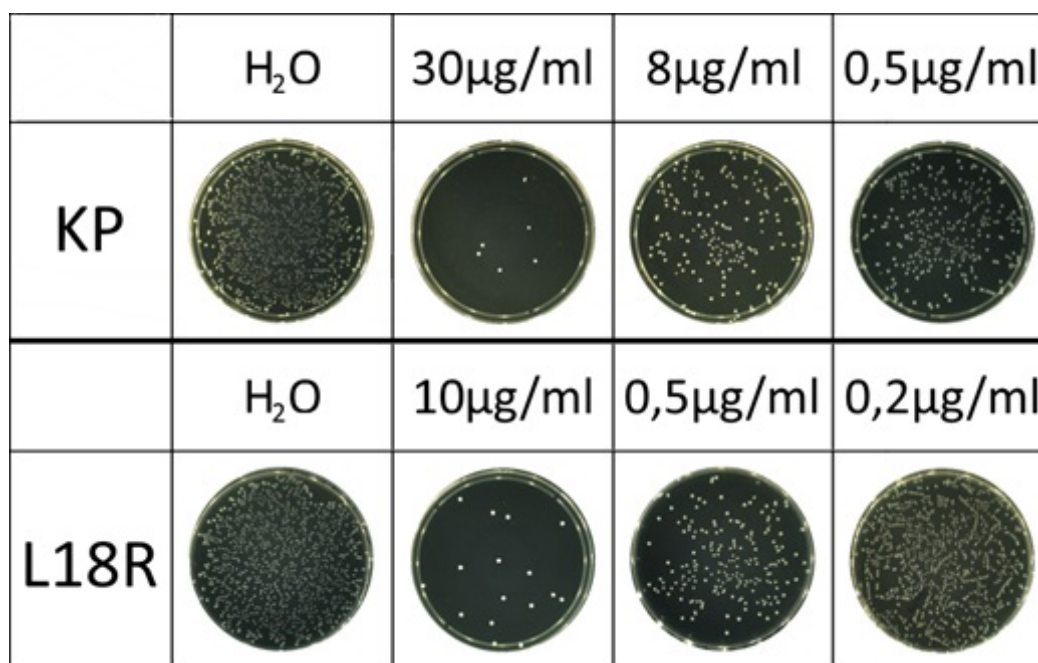


Figura 20 - Saggio delle unità formanti colonia. Piastre rappresentative dell'inibizione della crescita di *E. faecalis* ATCC 29212 in presenza di diverse concentrazioni di KP (30 µg/ml, 8 µg/ml, 0,5 µg/ml) e L18R (10 µg/ml, 0,5µg/ml, 0,2 µg/ml), rispetto al controllo.

Attività di KP E L18R contro biofilms di *E. faecalis*

Entrambi i peptidi saggiati sono stati in grado di ridurre la biomassa di biofilm di *E. faecalis* ATCC 29212 e l'attività metabolica delle cellule del biofilm.

Nello specifico, come possiamo osservare in Figura 21, ad una concentrazione di 50 µg/ml di KP si osserva una riduzione del 35% della biomassa e del 43% della vitalità del biofilm. Alla stessa concentrazione, L18R determina una riduzione del 73% della biomassa e del 70% della vitalità del biofilm.

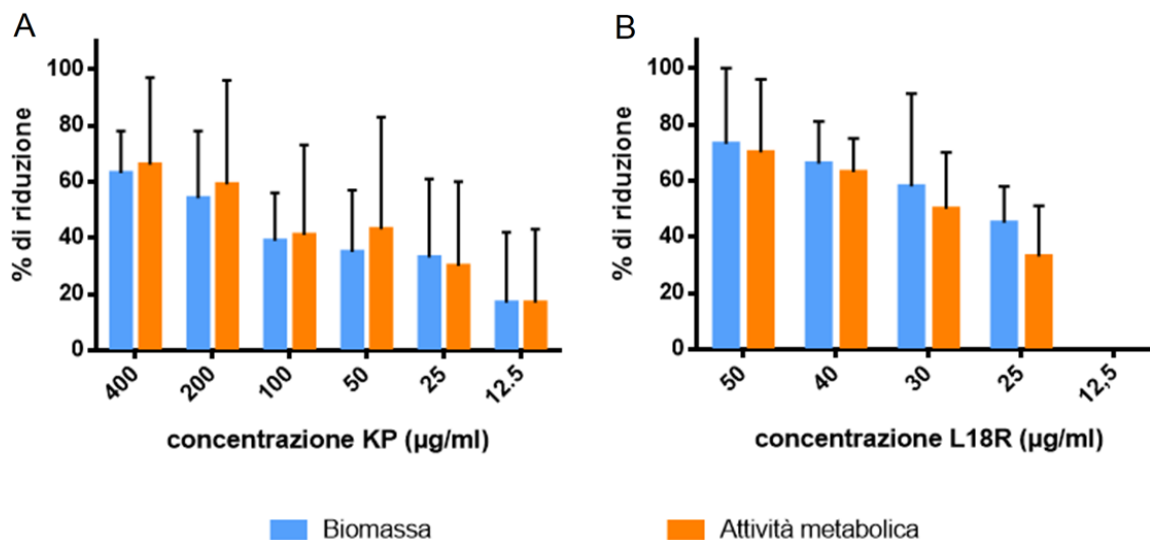


Figura 21 - Effetto di KP e L18R sulla formazione di biofilm di *E. faecalis* ATCC 29212. L'effetto di concentrazioni scalari di KP (A) e L18R (B) sulla riduzione della biomassa e dell'attività metabolica delle cellule del biofilm è stato quantificato rispettivamente mediante saggio con Crystal Violet e Alamar Blue, comparativamente al biofilm non trattato. I risultati rappresentano la media di almeno tre esperimenti indipendenti eseguiti in triplo \pm deviazione standard.

È stata inoltre calcolata l'EC₅₀ dell'attività inibente di KP e L18R sullo sviluppo del biofilm. Dalle tabelle si può notare come, rispetto all'attività dei peptidi sulle cellule planctoniche, l'attività dei peptidi nei confronti del biofilm sia inferiore (Tabella 7 e Tabella 8).

Tabella 7. Attività inibitoria *in vitro* di KP nei confronti di biofilm di *E. faecalis* ATCC 29212. EC₅₀: concentrazione in grado di produrre il 50% dell'effetto massimale.

	Saggio	EC ₅₀ (mol/l)	Intervallo di confidenza al 95% (mol/l)	
Riduzione della massa del biofilm	Crystal Violet	$1,607 \times 10^{-4}$	$1,021 \times 10^{-4}$	$2,531 \times 10^{-4}$
Riduzione della vitalità del biofilm	Alamar Blue	$1,235 \times 10^{-4}$	$0,795 \times 10^{-4}$	$1,920 \times 10^{-4}$

Tabella 8. Attività inibitoria *in vitro* di L18R nei confronti di biofilm di *E. faecalis* ATCC 29212. EC₅₀: concentrazione in grado di produrre il 50% dell'effetto massimale.

	Saggio	EC ₅₀ (mol/l)	Intervallo di confidenza al 95% (mol/l)	
Riduzione della massa del biofilm	Crystal Violet	1,411×10 ⁻⁵	1,099×10 ⁻⁵	1,811×10 ⁻⁵
Riduzione della vitalità del biofilm	Alamar Blue	1,585×10 ⁻⁵	1,340×10 ⁻⁵	1,873×10 ⁻⁵

Effetto di Ca(OH)₂, KP e L18R su biofilms di E. faecalis cresciuti su dischetti di HA. Analisi di microscopia confocale a scansione laser.

È stato valutato l'effetto dei peptidi su biofilm maturi di *E. faecalis* ATCC 29212 cresciuti per 48 h su dischetti di HA. Il controllo di crescita (con acqua sterile) e l'effetto del trattamento con una soluzione satura di Ca(OH)₂, con KP (100 µg/ml) e con L18R (50 µg/ml) per 24 h sono stati valutati mediante MCSL, dopo colorazione per la rilevazione della vitalità (FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit, Invitrogen, Paisley, UK), e attraverso una ricostruzione tridimensionale computerizzata della struttura lungo l'asse Z. L'intensità delle due colorazioni è stata quantificata con il software Imaris®.

Nella Figura 22 è riportata l'analisi al MCSL del controllo con H₂O, dove è visibile un biofilm ben formato, dallo spessore uniforme di circa 30 µm e prevalentemente costituito da cellule verdi, ovvero cellule vive.

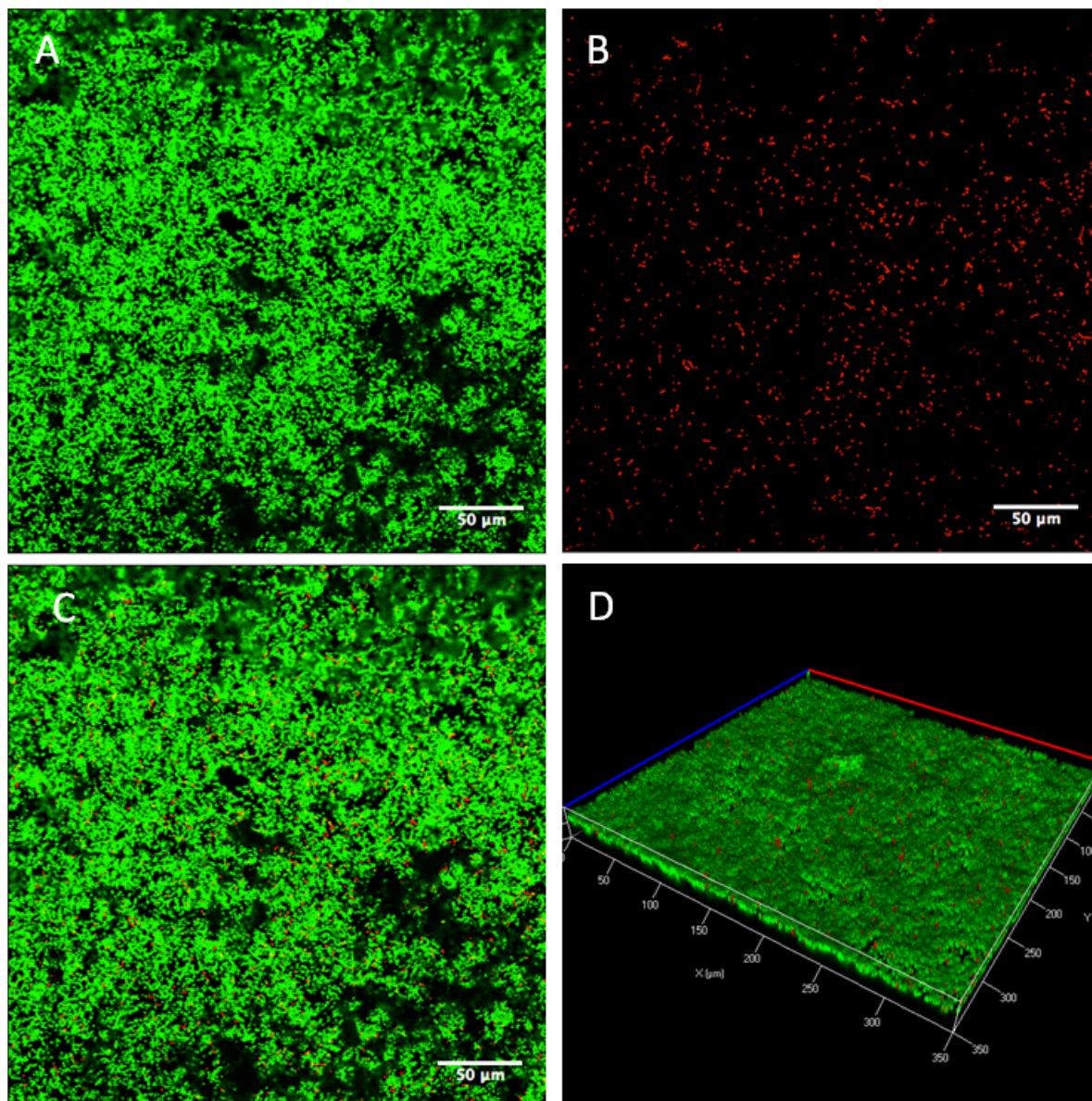


Figura 22 - Immagini ottenute mediante MCSL di biofilm sviluppatosi su un disco di HA dopo 24 h di incubazione con una sospensione di *E. faecalis* ATCC 29212 e H₂O, dopo colorazione per la rilevazione della vitalità mediante LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit (controllo non trattato). A) fluorescenza del canale verde; B) fluorescenza del canale rosso; C) sovrapposizione delle immagini del canale verde e rosso; D) ricostruzione tridimensionale ottenuta combinando le scansioni acquisite con entrambi i canali; verde: cellule vive; rosso: cellule morte.

Nella Figura 23 è visibile l'analisi al MCSL del biofilm trattato per 24 h con una soluzione satura di Ca(OH)₂. Se confrontato con il controllo in H₂O, si apprezza non solo un biofilm meno consistente e irregolare, ma anche un aumento delle cellule morte e una diminuzione di quelle vive.

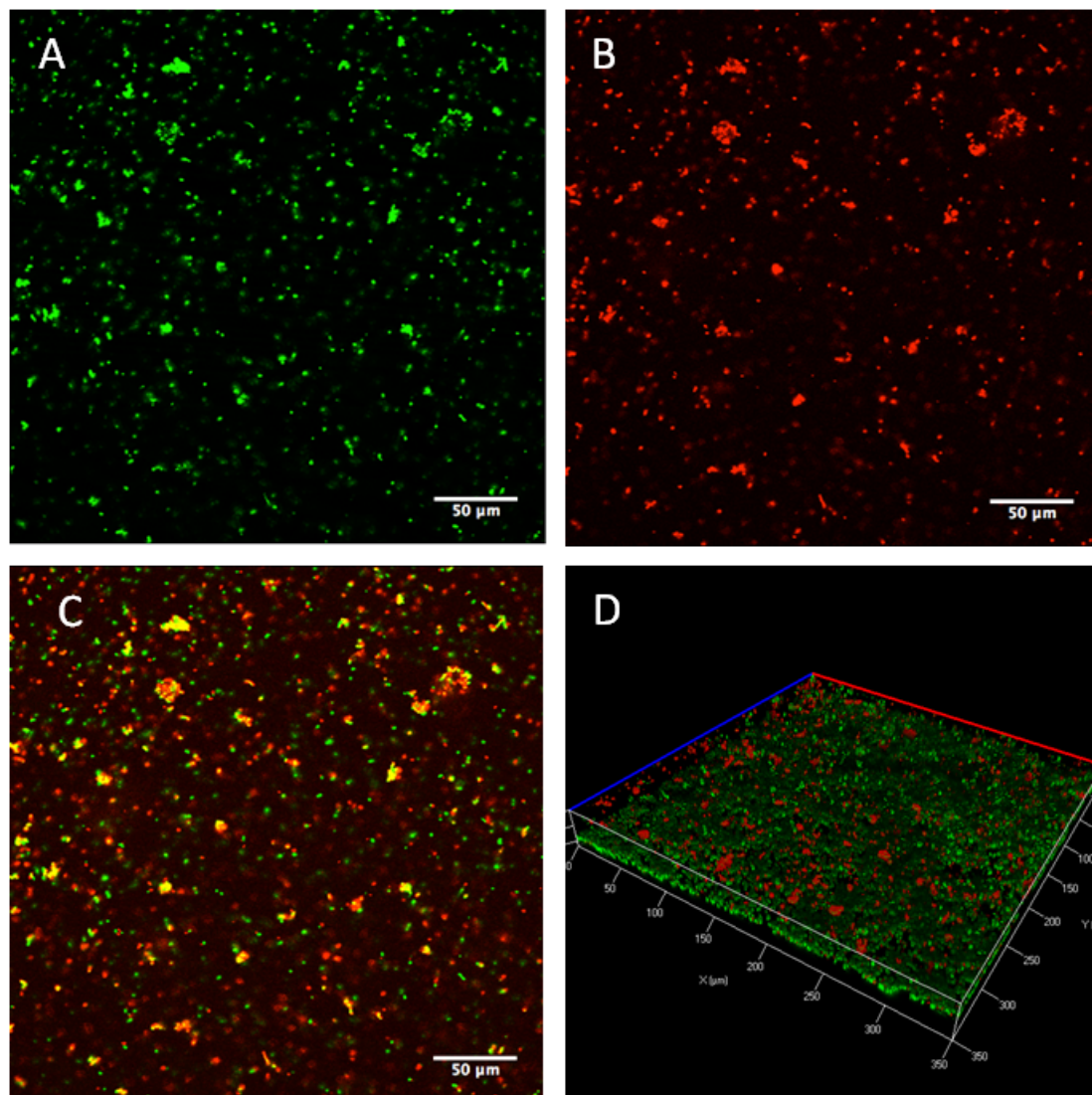


Figura 23 - Immagini ottenute mediante M-CSL di biofilm sviluppatosi su un disco di HA dopo 24 h di incubazione con una sospensione di *E. faecalis* ATCC 29212 trattato con una soluzione satura di Ca(OH)_2 , dopo colorazione per la rilevazione della vitalità mediante LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit. A) fluorescenza del canale verde; B) fluorescenza del canale rosso; C) sovrapposizione delle immagini del canale verde e rosso; D) ricostruzione tridimensionale ottenuta combinando le scansioni acquisite con entrambi i canali; verde: cellule vive; rosso: cellule morte.

In Figura 24 sono riportate le analisi al M-CSL del biofilm di *E. faecalis* trattato con KP 100 µg/ml per 24 h. Come per il trattamento con Ca(OH)_2 , anche in questo caso il biofilm appare meno consistente e vi è un aumento di cellule morte.

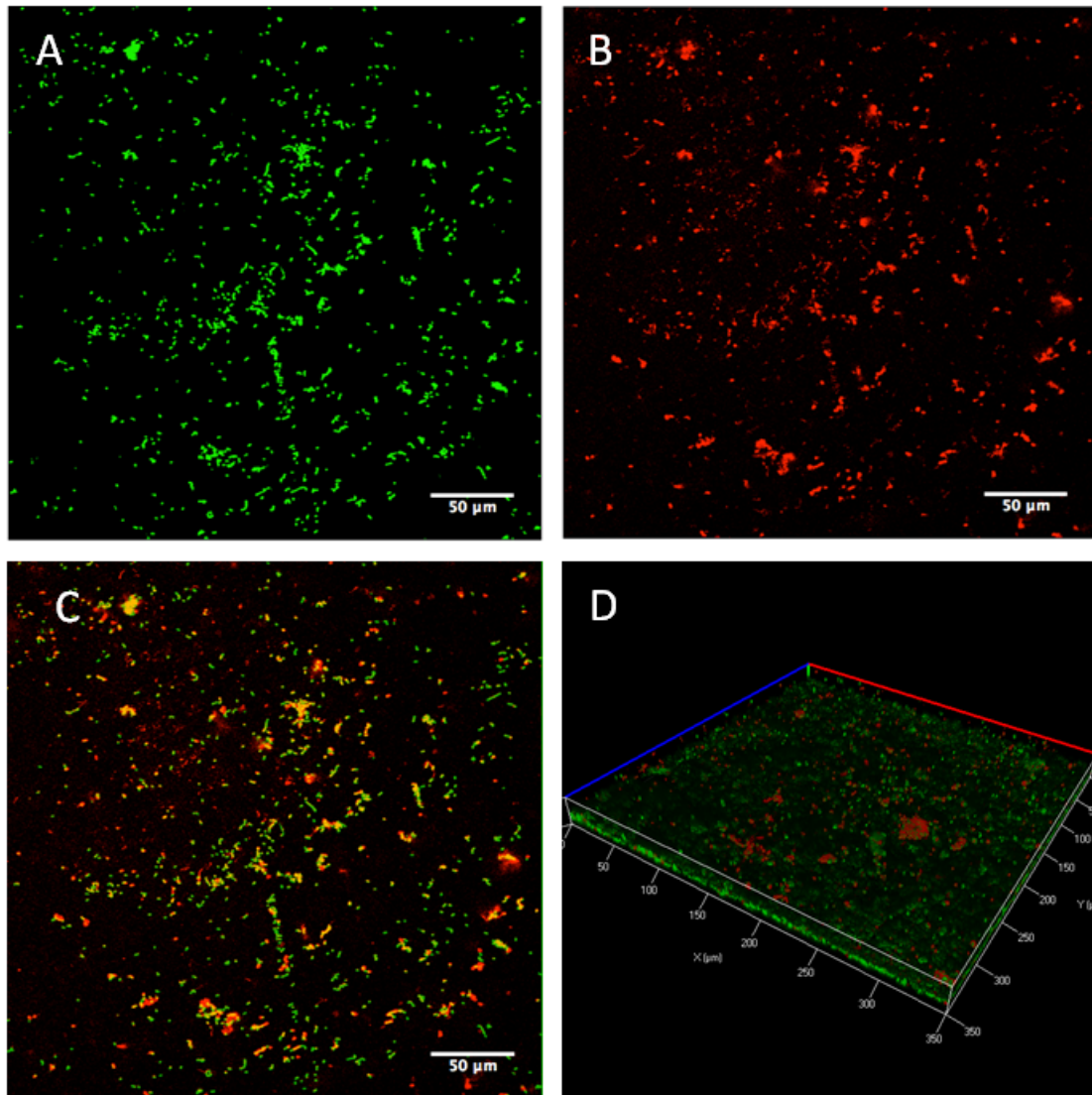


Figura 24 - Immagini ottenute mediante M-CSL di biofilm sviluppatosi su un disco di HA dopo 24 h di incubazione con una sospensione di *E. faecalis* ATCC 29212 trattato con KP (100 µg/ml), dopo colorazione per la rilevazione della vitalità mediante LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit. A) fluorescenza del canale verde; B) fluorescenza del canale rosso; C) sovrapposizione delle immagini del canale verde e rosso; D) ricostruzione tridimensionale ottenuta combinando le scansioni acquisite con entrambi i canali; verde: cellule vive; rosso: cellule morte.

L'analisi al M-CSL del biofilm trattato per 24 h con L18R 50 µg/ml mostra un significativo aumento del numero di cellule morte (Figura 25).

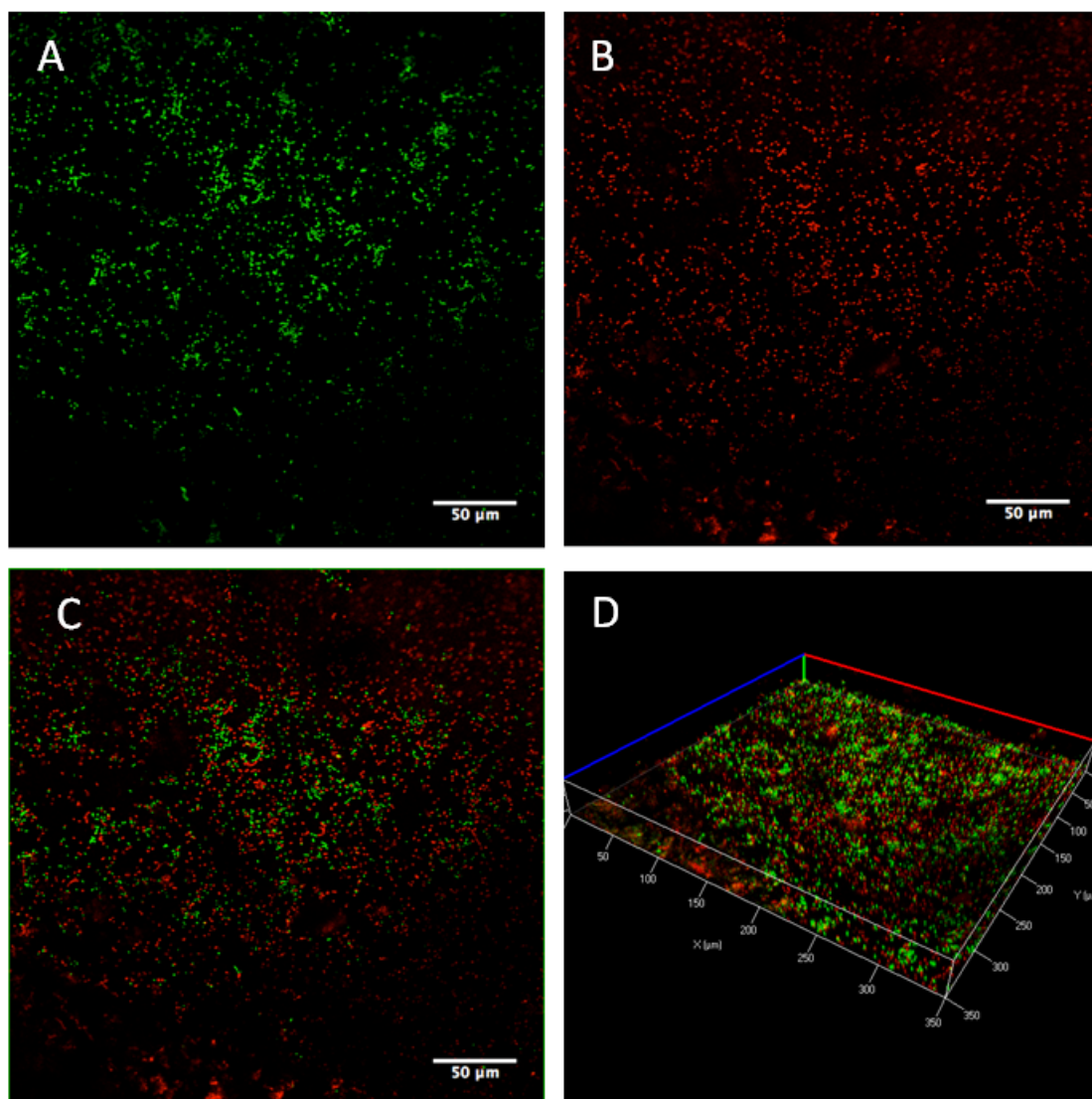


Figura 25 - Immagini ottenute mediante M-CSL di biofilm sviluppatosi su un disco di HA dopo 24 h di incubazione con una sospensione di *E. faecalis* ATCC 29212 trattato con L18R (50 μg/ml), dopo colorazione per la rilevazione della vitalità mediante LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit. A) fluorescenza del canale verde; B) fluorescenza del canale rosso; C) sovrapposizione delle immagini del canale verde e rosso; D) ricostruzione tridimensionale ottenuta combinando le scansioni acquisite con entrambi i canali; verde: cellule vive; rosso: cellule morte.

Nel grafico (Figura 26) è riportata l'analisi dell'intensità percentuale della fluorescenza delle cellule morte rispetto all'intensità totale, e si può osservare come L18R abbia un'efficacia statisticamente maggiore rispetto a KP e a Ca(OH)₂.

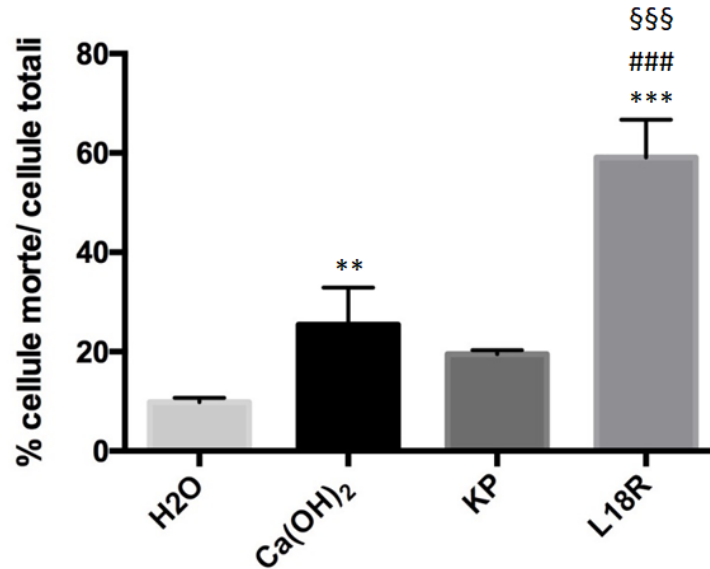


Figura 26 - Nel grafico sopra è riportata l'intensità percentuale della fluorescenza delle cellule morte rispetto all'intensità totale (rosso+verde).

(** = P <0,01, *** = P <0,001 Vs H2O; ### = P <0,001 Vs Ca(OH)₂, §§§ = P <0,001 Vs KP).

Effetto di Ca(OH)₂, KP e L18R su biofilms di E. faecalis cresciuti su dischetti di HA. Analisi di microscopia elettronica a scansione.

I biofilm maturi di *E. faecalis* ATCC 29212 sviluppati su dischetti di HA e trattati per 24 h con una soluzione satura di Ca(OH)₂, KP (100 µg/ml) e L18R (50 µg/ml) sono stati analizzati mediante microscopia elettronica a scansione. I dischetti rappresentativi del controllo di crescita sono stati trattati con acqua sterile e analizzati con lo stesso procedimento.

Inizialmente sono stati scansionati dei dischetti sterili per analizzarne la superficie che presentava una rugosità uniforme (Figura 27). Era possibile distinguere le singole particelle della polvere di HA da cui sono stati ottenuti i dischetti mediante compressione e cottura.

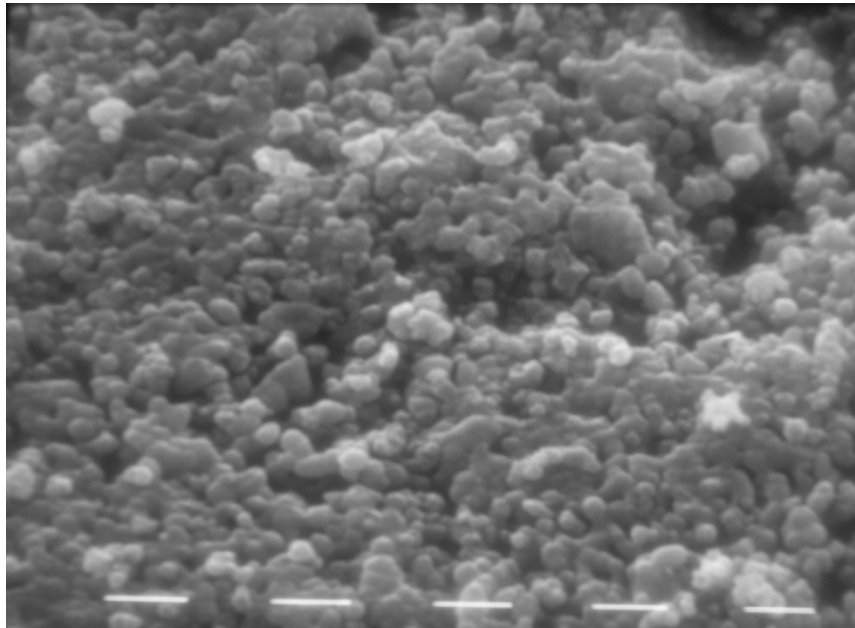


Figura 27 - Immagine al SEM dei dischetti di HA, ingrandimento 10000X, (barra 1 μm).

Sono quindi stati analizzati i biofilm presenti sui dischetti.

Nelle immagini del controllo H₂O (Figura 28) possiamo osservare una distribuzione uniforme del biofilm di *E. faecalis*.

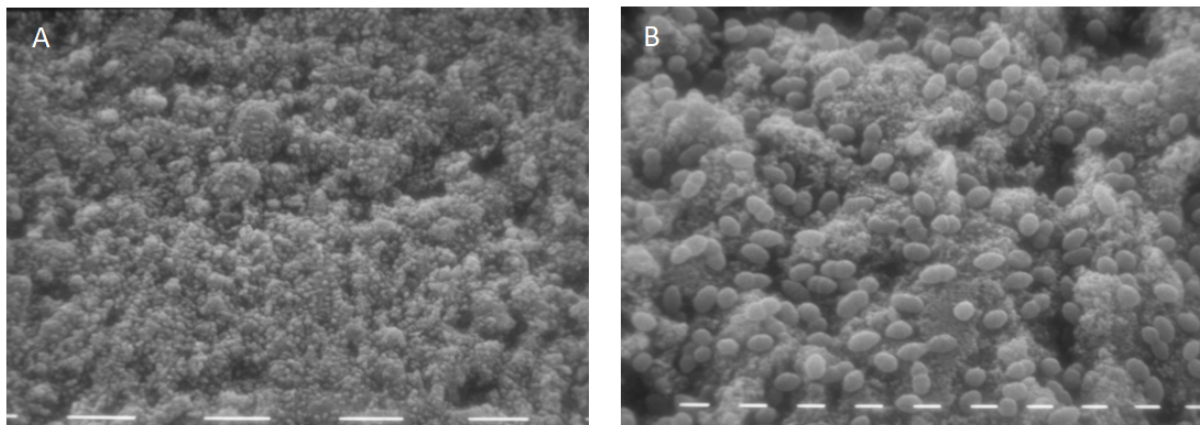


Figura 28 - Analisi al SEM a 24 h del controllo (H₂O) del biofilm di *E. faecalis* cresciuto per 48 h su dischetti di HA. A) ingrandimento 1250X (barra = 10 μm); B) ingrandimento di 5000X (barra = 1 μm).

L'analisi al SEM del trattamento con Ca(OH)_2 (Figura 29) mostra alcune differenze nel biofilm di *E. faecalis* rispetto al controllo con H_2O , in particolar modo relative alla distribuzione dei batteri sulla superficie del dischetto, oltre che al numero dei batteri presenti.

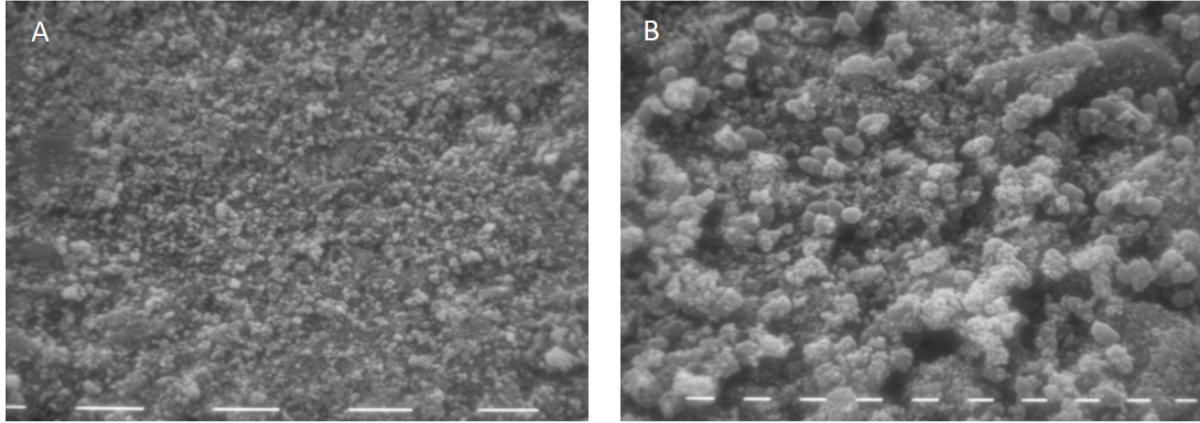


Figura 29 - Analisi al SEM dell'effetto dopo 24 h di trattamento con una soluzione satura di Ca(OH)_2 su biofilm di *E. faecalis* cresciuto per 48 h su dischetti di HA. A) ingrandimento di 1250X (barra = 10 μm); B) ingrandimento di 5000X (barra = 1 μm).

Le immagini ricavate dopo trattamento con KP (Figura 30) mostrano una particolarità legata alla formazione di reticoli formati in seguito all'aggregazione del peptide sulle cellule di *E. faecalis* (Figura 31), in accordo con quanto precedentemente osservato su cellule di lievito (236). Anche in questo caso, come nei campioni trattati con Ca(OH)_2 , il numero di cellule era inferiore rispetto ai controlli non trattati.

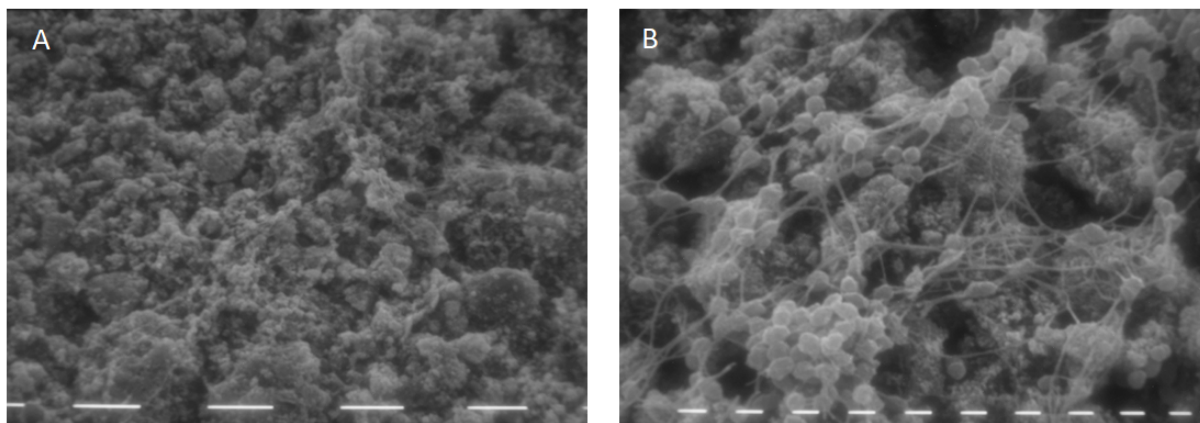


Figura 30 - Analisi al SEM dell'effetto dopo 24 h di trattamento con KP alla concentrazione di 100 $\mu\text{g/ml}$ su biofilm di *E. faecalis* cresciuto per 48 h su dischetti di HA. A) ingrandimento di 1250X (barra = 10 μm); B) ingrandimento di 5000X (barra = 1 μm).

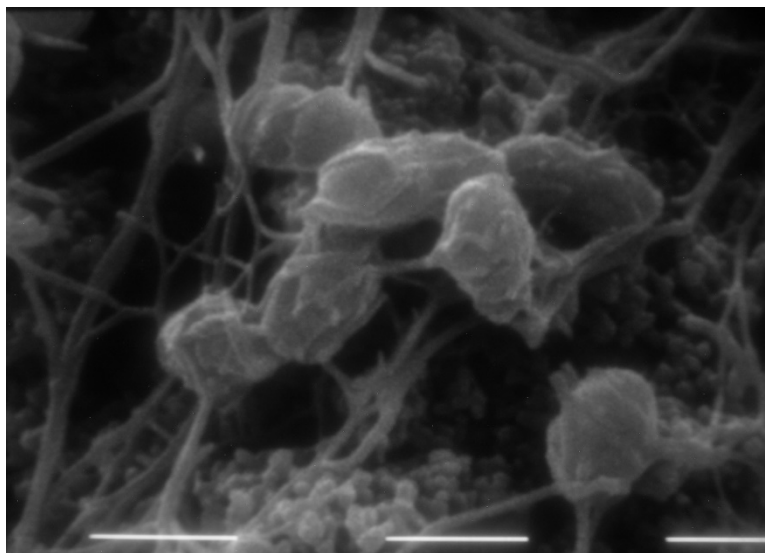


Figura 31 Particolare dei reticoli formati da KP in seguito all'aggregazione dopo 24 h sulle cellule di *E. faecalis*. Ingrandimento 20000X, barra = 1 μ m.

Nei campioni trattati con L18R (Figura 32) si osserva una marcata riduzione del numero di cellule rispetto al controllo con H₂O, a testimonianza dell'azione battericida del peptide.

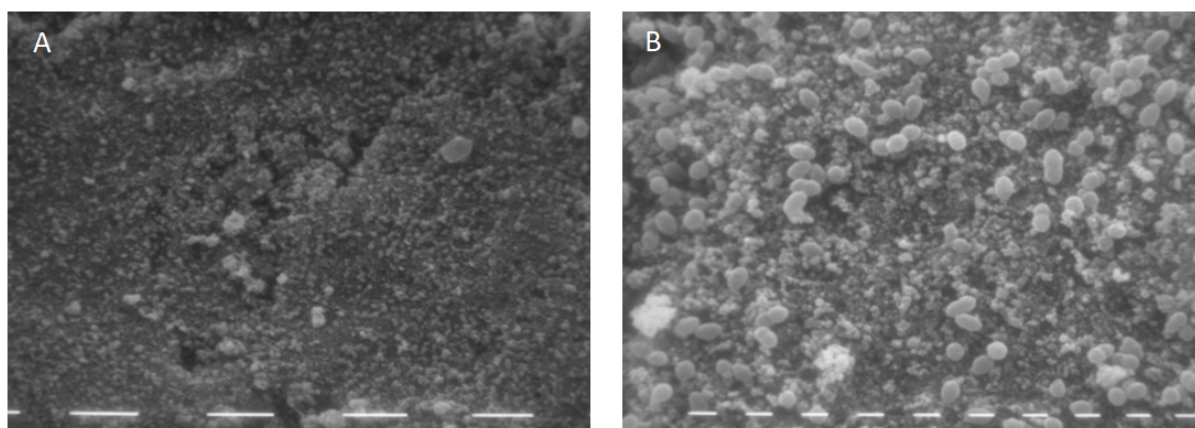


Figura 32 - Analisi al SEM dell'effetto dopo 24 h di trattamento con L18R alla concentrazione di 50 μ g/ml su biofilm di *E. faecalis* cresciuto per 48 h su dischetti di HA. A) ingrandimento di 1250X (barra = 10 μ m); B) ingrandimento di 5000X (barra = 1 μ m).

Nella Figura 33 è riportata l'analisi grafica relativa alla percentuale della superficie del dischetto di HA occupato da cellule adese. In accordo con i risultati precedenti, il campione trattato con L18R presenta la percentuale più bassa come conseguenza della capacità del peptide di determinare il distacco del biofilm dalla superficie di HA.

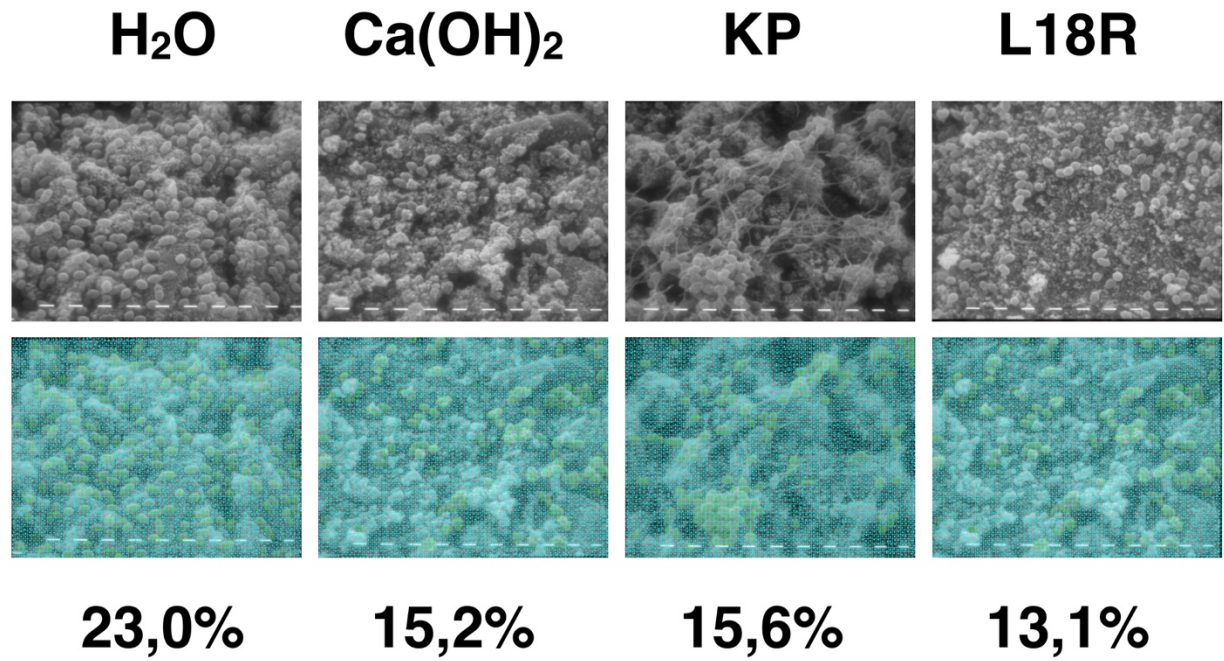


Figura 33 – Calcolo del rapporto fra superficie occupata da cellule adese e superficie totale

Discussione

In relazione all'eziologia infettiva delle patologie pulpari e periradicolari, una parte significativa della ricerca in campo endodontico si è sempre concentrata sullo sviluppo di nuovi agenti antimicrobici in grado di eradicare efficacemente l'infezione intracanalare senza determinare danni all'ospite. Oltre a queste proprietà, gli agenti antimicrobici in ambito endodontico dovrebbero essere facilmente utilizzabili, non dovrebbero interferire con le fasi successive di otturazione canalare/ricostruzione post-endodontica e, se possibile, dovrebbero avere dei costi contenuti.

Sebbene la decontaminazione mediante preparazione chemio-meccanica sia considerata sufficiente nella maggior parte delle condizioni cliniche, vi sono alcune situazioni in cui vengono utilizzate medicazioni intracanalari con l'obiettivo di abbattere la carica microbica. Attualmente, la medicazione intermedia universalmente più impiegata è $\text{Ca}(\text{OH})_2$, la cui sicurezza clinica è confermata dal suo secolare utilizzo (244). La sua azione antibatterica è dovuta alla natura fortemente alcalina e si esplica mediante l'induzione di danni alla membrana citoplasmatica, denaturazione delle proteine batteriche ed effetti negativi a carico del DNA (227).

Nonostante le sue proprietà antibatteriche, l'efficacia clinica di $\text{Ca}(\text{OH})_2$ è notevolmente ridotta dal potere tampone della dentina. Inoltre, alcuni patogeni endodontici, fra i quali *E. faecalis*, sono in grado di resistere in ambienti alcalini (37, 245). Per questi motivi, la ricerca in ambito endodontico si è concentrata sulla possibilità di sviluppare nuovi composti da utilizzare in combinazione o in sostituzione alle medicazioni intermedie tradizionali.

Per la loro attività ad ampio spettro, per la scarsa tendenza a indurre recidive e per la loro efficacia anti-biofilm, i peptidi antimicrobici hanno suscitato grande interesse per un loro possibile impiego per il controllo delle infezioni, anche in campo endodontico (62).

In questo studio *in vitro* sono stati testati per la prima volta gli effetti di due peptidi sintetici, KP e L18R, dalle già verificate capacità antimicrobiche, nei confronti del patogeno endodontico *E. faecalis* ATCC 29212. Inizialmente, è stato possibile osservare assenza di tossicità da parte di entrambi i peptidi nei confronti di fibroblasti L929. L'esposizione ai peptidi fino a 400 µg/ml per 24 h non ha

infatti ridotto la vitalità delle cellule murine. Questo dato conferma quanto già precedentemente verificato nei confronti di eritrociti per KP (60), e *in vivo* in modelli di *G. melonella* per L18R (242). Le cellule murine L929 sono state scelte sia per motivi di praticità, essendo già disponibili all'interno del laboratorio, e sia perché sono già state utilizzate per testare la citotossicità di peptidi antimicrobici di interesse endodontico (100).

In uno studio del 2015, Dianat et al. hanno valutato la citotossicità di due formulazioni di Ca(OH)_2 nei confronti di fibroblasti L929 mediante il saggio MTT, lo stesso utilizzato nel presente lavoro. I risultati dello studio hanno mostrato che la citotossicità di Ca(OH)_2 diminuiva nel tempo per entrambe le formulazioni. Dopo 24 h di esposizione, i campioni trattati con le due formulazioni di Ca(OH)_2 presentavano, rispettivamente, il 55% e il 45% di vitalità rispetto ai campioni non trattati (246). Sebbene nel nostro studio non sia stato effettuato un confronto diretto, i dati dello studio di Dianat et al. portano a ritenere che i peptidi KP e L18R non siano più citotossici di Ca(OH)_2 nei confronti delle cellule L929.

L'attività antibatterica dei peptidi KP e L18R è stata testata inizialmente nei confronti di *E. faecalis* ATCC 29212 in forma planctonica. Entrambi i peptidi hanno dimostrato una buona attività inibente, mostrando una EC_{50} rispettivamente di 4,520 $\mu\text{mol/l}$ e 0,3624 $\mu\text{mol/l}$. Questi dati, sebbene siano utili per confrontare l'attività antibatterica dei peptidi nei confronti di altri microrganismi già testati, ci offrono scarse informazioni sulla potenziale efficacia nei confronti di infezioni endocanalari. In condizioni cliniche, infatti, le infezioni endodontiche sono in genere sostenute da cellule microbiche organizzate in biofilm, la cui suscettibilità agli agenti antimicrobici è molto ridotta rispetto al loro stato planctonico. Pertanto, si è deciso di valutare l'attività inibente di KP e L18R nelle fasi precoci di formazione di biofilm. In particolare, è stato utilizzato il saggio con Crystal Violet (CV) per misurare la riduzione della biomassa del biofilm di *E. faecalis* ATCC 29212 dopo esposizione ai peptidi. Il CV è un colorante basico che colora i nuclei delle cellule legandosi esternamente al DNA. È in grado di legarsi anche a molecole di superficie cariche negativamente e ai polisaccaridi della matrice extracellulare. Il saggio con CV viene utilizzato per ottenere dati quantitativi circa la densità

di cellule aderenti al fondo di un pozzetto di una piastra per microtitolazione ed è impiegato negli studi sulle fasi precoci di formazione del biofilm. Questa tecnica si è mostrata affidabile e riproducibile mostrando una correlazione lineare fra assorbanza, misurata come densità ottica, e numero di cellule (247). Il limite principale di questa tecnica è che il CV colora l'intera massa del biofilm, comprese le cellule morte, quiescenti, e la matrice poliasaccaridica extracellulare. I risultati di questo test hanno mostrato che, a una concentrazione di 50 µg/ml di KP, si osserva una riduzione della massa del biofilm del 35%, mentre, alla stessa concentrazione, L18R determina una riduzione del 73%.

Per misurare la riduzione dell'attività metabolica del biofilm in seguito all'esposizione ai peptidi è stato utilizzato il saggio Alamar Blue (AB). Il saggio si basa sull'utilizzo di un indicatore colorimetrico non tossico (resazurina) che varia in risposta all'attività metabolica cellulare: le cellule metabolicamente attive riducono resazurina a resufurina, mentre le cellule non vitali non sono in grado di ridurlo e generano un segnale proporzionalmente inferiore, misurabile come fluorescenza o assorbanza. Questo saggio è ampiamente utilizzato in letteratura perché presenta numerosi punti di forza, tra cui la flessibilità (i risultati possono essere ottenuti sia per via colorimetrica che per fluorometria e la metodica si può applicare sia a cellule in sospensione che a cellule adese), la non tossicità, l'affidabilità, l'alta sensibilità (è in grado di rilevare fino a 50 cellule) e la stabilità nel tempo. Inoltre, risulta più economico rispetto ad altri test per valutare l'attività metabolica dei biofilm.

I risultati di questo saggio hanno mostrato che a una concentrazione di 50 µg/ml di KP si osserva una riduzione dell'attività metabolica del biofilm del 43% mentre, alla stessa concentrazione, L18R determina una riduzione del 70%.

Confrontando i valori di EC₅₀ di KP e L18R relativi alla riduzione della biomassa e dell'attività metabolica del biofilm con i valori di EC₅₀ ottenuti con i saggi di CFU, risulta confermata la maggior sensibilità di *E. faecalis* ATCC 29212 a L18R rispetto a KP. Inoltre, la differenza di tre ordini di grandezza fra le EC₅₀ relative al biofilm e quelle relative alle cellule allo stato planctonico sottolinea l'importanza dell'organizzazione dei microrganismi in biofilm nella resistenza agli agenti

antibatterici.

La crescita dei biofilm di *E. faecalis* su dischetti di HA aveva come scopo quello di mimare più fedelmente quello che avviene nel corso di un'infezione endodontica, permettendo così una valutazione *in vitro* dell'efficacia dei peptidi testati. È stato infatti dimostrato in passato che questo modello è in grado di riprodurre le interazioni biologiche che si sviluppano tra le medicazioni e la dentina infetta (248-250).

L'effetto dei trattamenti sui biofilm di *E. faecalis* è stato valutato mediante microscopia confocale a scansione laser (MCSL) e microscopia elettronica a scansione (SEM).

I principi della microscopia a scansione sono stati proposti per la prima volta da Marvin Minsky nel 1957 (251). I progressi tecnologici relativi all'utilizzo dei laser e dei computer negli anni '80 e '90 hanno rinnovato l'interesse per le tecniche di microscopia a scansione laser. Gli sviluppi di queste tecniche negli ultimi vent'anni hanno reso la MCSL routinaria per lo studio di molecole, cellule e tessuti viventi. I moderni sistemi di MCSL sono sistemi elettronici integrati in cui un microscopio ottico è supportato da un sensore elettronico, un computer e diversi sistemi laser con diverse lunghezze d'onda. La tecnica permette il sezionamento ottico del campione per produrre immagini di alta qualità a diverse profondità. Mediante l'utilizzo di particolari fluorofori è possibile evidenziare selettivamente molecole, cellule o tessuti.

Nel nostro studio i biofilm sono stati colorati mediante un kit di colorazione che permette di evidenziare due saggi di vitalità batterica, basandosi sull'integrità della membrana. Questo kit utilizza un mix di un colorante verde (SYTO™ 9) e un colorante rosso (ioduro di propidio). Queste colorazioni differiscono nella loro capacità di penetrazione nelle cellule batteriche vive. Quando i coloranti vengono usati insieme, il verde si lega alle membrane intatte delle cellule batteriche, mentre il rosso penetra solamente le membrane danneggiate. Sotto l'opportuna radiazione di eccitazione, sono messe in risalto le strutture cellulari interessate, che in luce bianca non sarebbero visibili.

Il microscopio confocale ha permesso quindi di visualizzare in verde le cellule vive e in rosso le cellule morte presenti sulla superficie del dischetto.

Le immagini sono state acquisite per ciascuno dei gruppi di *E. faecalis*: gruppo controllo con H₂O, gruppo trattato con una soluzione satura di Ca(OH)₂ e quelli trattati con i due peptidi oggetto del nostro studio.

Grazie alla possibilità di selezionare la fluorescenza di interesse, sono state acquisite immagini delle sole cellule vive, delle sole cellule morte e immagini comprendenti entrambe. È stato poi possibile effettuare una ricostruzione 3D che mimasse la presenza del biofilm sul dischetto.

Le immagini mostrano come, nel caso dei dischetti controllo, trattati con H₂O, il biofilm appaia ben formato e ben distribuito sulla superficie del dischetto. Osservando le immagini delle sole cellule vive e delle sole cellule morte è evidente come il numero di cellule vive sia notevolmente superiore.

Le immagini ricavate dai dischetti dei biofilm trattati con Ca(OH)₂ e con i peptidi mostrano una notevole differenza rispetto al controllo con H₂O, sia per quanto riguarda la qualità del biofilm, molto meno denso, sia per quanto riguarda la presenza di cellule morte.

L'analisi statistica dell'intensità di fluorescenza delle cellule morte rispetto le cellule totali ha mostrato come l'azione di riduzione del biofilm da parte di Ca(OH)₂ fosse inferiore rispetto a quella di L18R.

I dischetti di HA sono poi stati analizzati mediante SEM. Questa tecnica produce immagini di un campione attraverso la scansione della sua superficie con un fascio concentrato di elettroni. I campioni biologici vengono preparati per aumentarne la conduttività elettrica mediante elettrodeposizione di un sottilissimo strato di un materiale conduttore, generalmente oro, palladio o platino. I campioni vengono osservati in camere a vuoto spinto dove viene generato un flusso di elettroni, a partire da un filamento di tungsteno. Il flusso viene direzionato e controllato mediante lenti elettromagnetiche in modo da permettere la scansione del campione. Gli elettroni interagiscono con gli atomi del campione, producendo dei segnali che contengono informazioni sulla topografia di superficie e sulla composizione del campione. Queste informazioni vengono lette da appositi rilevatori e tradotte in immagini in bianco e nero con una risoluzione fino a 1 nm (252).

I dischetti analizzati con il SEM permettono una visualizzazione tridimensionale del biofilm presente

sui dischetti di HA. Anche in questo caso è osservabile come vi sia una differenza notevole tra il biofilm presente sui dischetti di controllo e quello sui dischetti trattati. Su questi ultimi infatti è presente un biofilm alterato, con un ridotto numero di cellule adese alla superficie.

Gli studi presentati in questa tesi rappresentano le prime indagini sull'effetto dei peptidi KP e L18R nei confronti di un patogeno endodontico. In futuro sarà interessante studiare l'effetto di altre concentrazioni rispetto a quelle utilizzate negli studi di MCSL e SEM. Inoltre sarà opportuno testare un modello *in vitro* che, al posto dei dischetti di HA, utilizzi come supporto la dentina, per indagare l'effetto antibatterico all'interno dei tubuli dentinali. Sarà necessario valutare le proprietà antibatteriche dei peptidi nei confronti di altri ceppi batterici implicati nelle infezioni endodontiche e in particolare dovranno essere utilizzati biofilm multispecie in grado di riprodurre più fedelmente le infezioni intracanalari.

Conclusioni

La composizione microbica dei canali dentari infetti presenta molte affinità con quella del cavo orale, da cui provengono i microrganismi che sostengono le infezioni endodontiche (20, 253). Il microbioma specifico del canale radicolare viene definito da una selezione dei microrganismi ad opera del passaggio attraverso le strutture dentali coronali, la disponibilità di ossigeno e di nutrienti e la risposta dell'ospite (141, 254). La composizione del microbioma nelle infezioni endodontiche è molto variabile, tuttavia le diverse comunità microbiche che si vengono a formare sono in grado di sostenere una comune patologia endodontica. Una situazione simile si riscontra nella malattia parodontale, dove diverse comunità microbiche composte da specie differenti possono svolgere la stessa funzione nel sostenere la malattia e determinare la perdita di attacco parodontale (255). Il quadro è reso ancora più complesso dal fatto che il processo patologico non è determinato solamente dalla interazione fra i microrganismi, ma coinvolge anche l'interfaccia dinamica microrganismi-ospite. Nella maggior parte delle situazioni si raggiunge un relativo equilibrio fra microrganismi e difese dell'ospite. Durante l'esacerbazione di una parodontite apicale non è chiaro se l'acutizzazione sia dovuta a una reazione dell'ospite a una modifica dell'ecosistema microbico o se i microrganismi reagiscono, invece, a una variazione dello stato dell'ospite. E' stato osservato che, anche senza trattamento endodontico, la fase acuta della parodontite apicale può risolversi, sebbene il quadro infiammatorio non scompaia (256). Quando il canale radicolare viene trattato endodonticamente, l'equilibrio che si era stabilito fra microrganismi e ospite viene profondamente alterato.

Il ruolo dei funghi nella complessità delle comunità microbiche dei canali infetti non è stato ancora completamente chiarito, tuttavia, alcuni studi hanno mostrato che i microrganismi appartenenti a questo regno possono essere coinvolti in molti processi. *Candida* è in grado di co-aggregarsi con gli streptococchi, favorendo la colonizzazione fungina delle superfici orali (257). Funghi e batteri possono inoltre mostrare un rapporto interdipendente per quanto riguarda l'approvvigionamento dei nutrienti. *Candida*, infatti, è in grado di metabolizzare il lattato prodotto da *Streptococcus mutans*, il quale a sua volta è in grado di aumentare il pH favorendo la crescita di entrambi (258). E' stato

osservato, inoltre, che le interazioni fra batteri e funghi possono modificarne la virulenza. Per esempio nei topi è stato osservato che la co-infezione di *Streptococcus oralis* e *Candida albicans* può portare ad una aumentata colonizzazione, maggior sviluppo di candidosi superficiale e infezione degli organi interni (259). Particolarmente interessante è anche il riscontro che la presenza di funghi e batteri può influenzare la risposta dell'ospite. E' stato dimostrato infatti che monociti esposti a frammenti fungini o batterici possono rispondere ad un successivo stimolo con una aumentata o diminuita produzione di citochine (260).

Da tutte queste considerazioni si evince che le interazioni fra batteri, funghi e ospite sono molto complesse e ulteriori studi sono necessari per chiarire meglio i processi coinvolti nelle infezioni endodontiche. Con molta probabilità infezioni miste con determinati tratti di virulenza possono determinare specifici quadri sintomatologici. Alcune specie sono già state associate a specifiche forme di parodontite apicale (17). Inoltre, appare plausibile che comunità microbiche miste batteriche e fungine rendano il trattamento delle infezioni endodontiche più difficoltoso. Essendo i microrganismi appartenenti al regno dei batteri e dei funghi diversi per morfologia e fisiologia, differenti strategie terapeutiche potrebbero essere necessarie per risolvere infezioni sostenute da comunità miste.

Un altro aspetto importante è l'ipotesi che l'infiammazione cronica secondaria alla parodontite apicale possa essere correlata ad alcune patologie sistemiche, sebbene un effettivo rapporto di causa-effetto non sia stato ancora dimostrato (261). L'interfaccia fra il canale radicolare infetto e i tessuti periapicali fornisce una porta d'ingresso ai microrganismi per determinare malattie localizzate e, potenzialmente, sistemiche. Questi microrganismi possono colonizzare zone distanti dell'ospite, in particolare se predisposto, come pazienti anziani o immuno-compromessi. Il livello di salute orale e sistemica è in continuo miglioramento, come del resto le nuove possibilità terapeutiche per patologie che determinano un accorciamento della durata della vita. E' pertanto prevedibile che sempre più pazienti anziani e persone immuno-compromesse manterranno i propri denti a lungo nella vita. La necessità di trattamenti più efficaci nei confronti di infezioni endodontiche batteriche e fungine deve

essere valutata anche tenendo conto dei possibili effetti sistemici delle patologie endodontiche e dell'aumento popolazione a rischio.

La complessità dell'ecologia delle infezioni endodontiche può essere una delle cause del limitato miglioramento nel tasso di successo delle terapie endodontiche osservato nel corso degli anni (5). Infatti, sebbene l'introduzione di nuovi strumenti e di nuovi materiali abbia permesso di migliorare e facilitare l'esecuzione del trattamento endodontico, l'efficacia nei confronti della parodontite apicale è rimasta pressoché immutata. Pertanto la ricerca attualmente si sta focalizzando sull'elaborazione di nuove strategie antimicrobiche per la decontaminazione del canale. In questa tesi è stato studiato un possibile nuovo approccio terapeutico mediante l'utilizzo di peptidi antimicrobici di derivazione anticorpale. I risultati preliminari relativi a L18R sono molto promettenti. Tuttavia, questi risultati si basano su studi *in vitro* in cui sono stati utilizzati modelli di biofilm con un ceppo batterico di laboratorio. Come è noto, gli studi in laboratorio sono fondamentali perché permettono la simulazione molto controllata di certe realtà cliniche in cui una singola variabile può essere modificata volta per volta. Sebbene il ceppo utilizzato di *E. faecalis* sia di isolamento clinico, anni di coltivazione in laboratorio ne potrebbero aver modificato le proprietà. Questo microrganismo è stato utilizzato come modello per la sua alta frequenza nelle infezioni secondarie e per la facilità con la quale può essere coltivato in laboratorio. Le osservazioni effettuate *in vitro* non possono essere direttamente traslate nella situazione clinica. Ulteriori studi sono necessari per testare l'efficacia dei peptidi antimicrobici, e di L18R in particolare, nei confronti di comunità microbiche più complesse all'interno di una realtà anatomica peculiare come il sistema endocanalare. Prima di considerare il loro utilizzo clinico, molti altri ostacoli dovranno essere superati. Innanzitutto il peptide dovrà dimostrarsi sicuro per il paziente. Il test di citotossicità nei confronti di cellule murine presentato in questa tesi ha dato buoni risultati. Tuttavia occorre confermare questi dati con saggi su altre cellule eucariote, incluse cellule umane, e verificare eventuali effetti negativi sull'ospite in un modello *in vivo*.

Un aspetto da tenere in considerazione per ipotizzare un possibile utilizzo clinico di una medicazione canalare a base di peptidi antimicrobici è che eventuali residui della sostanza antisettica potrebbero

influenzare negativamente il sigillo dell'otturazione canalare. Idealmente, dovrebbe essere possibile rimuovere completamente la sostanza antisettica prima del riempimento dello spazio endodontico con il materiale da otturazione canalare. La verifica di questa condizione dovrà essere affrontata prima di una possibile implementazione del peptide nella pratica clinica.

Negli ultimi 30 anni la ricerca si è concentrata soprattutto su aspetti tecnici legati alla sagomatura dello spazio endodontico, ma, apparentemente, dall'innovazioni introdotte nella pratica clinica non ne sono derivati miglioramenti significativi per quanto riguarda le percentuali di successo del trattamento (5). Con le attuali tecniche, raggiungere una completa sterilità dello spazio endodontico è praticamente irrealizzabile. Tuttavia, quando nel sistema canalare e in particolare nel terzo apicale si raggiunge un livello sufficientemente basso di carica microbica, è possibile ottenere la riduzione di dimensioni e l'eliminazione della parodontite apicale (262). Sfortunatamente il livello cut-off di compatibilità della carica microbica nei confronti dell'ospite è sconosciuto e, inoltre, è impossibile da determinare con le limitazioni delle attuali tecniche di campionamento. Ne deriva pertanto che una possibile strategia alternativa per il controllo della parodontite apicale potrebbe essere la riduzione del processo infiammatorio periapicale, modulando la risposta dell'ospite. Diversi modulatori dell'infiammazione, in combinazione con la terapia antimicrobica convenzionale, sono stati suggeriti per regolare la risposta dell'ospite nella malattia parodontale (263). Simili modulatori potrebbero essere utilizzati anche in ambito endodontico. Un'altra strategia completamente diversa si basa sul fatto che molti denti affetti da parodontite apicale determinano pochi o nessun sintomo e sull'osservazione che, nonostante la prevalenza di parodontite apicale nei denti trattati endodonticamente sia del 36% (3), la loro sopravvivenza a 10 anni è dell'80% (264). Ciò porterebbe a ritenere che la risoluzione della parodontite apicale non sia sempre necessaria per la sopravvivenza del dente e il comfort del paziente. Questo approccio è in linea con il cambiamento di valutazione in molti aspetti della salute orale e, in quest'ottica, alcuni degli interventi odontoiatrici potrebbero essere considerati in realtà degli overtreatment.

La ricerca futura dovrà porsi come obiettivo quello di fare luce sulle interazioni fra i microrganismi

all'interno dell'ecosistema delle infezioni endodontiche e fra i microrganismi e l'ospite. Se verrà dimostrato un significativo effetto negativo a livello sistemico, la necessità di strategie più efficaci per eliminare o inattivare l'infezione, preservando la funzione e il benessere orale, risulterà ancora più forte.

Bibliografia

1. Quinonez C, Gibson D, Jokovic A, Locker D. Day surgery visits for dental problems. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2009;37(6):562-7.
2. McCaul LK, Jenkins WM, Kay EJ. The reasons for extraction of permanent teeth in Scotland: a 15-year follow-up study. *Br Dent J.* 2001;190(12):658-62.
3. Pak JG, Fayazi S, White SN. Prevalence of periapical radiolucency and root canal treatment: a systematic review of cross-sectional studies. *J Endod.* 2012;38(9):1170-6.
4. Ng YL, Mann V, Gulabivala K. Outcome of secondary root canal treatment: a systematic review of the literature. *Int Endod J.* 2008;41(12):1026-46.
5. Ng YL, Mann V, Rahbaran S, Lewsey J, Gulabivala K. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature - part 1. Effects of study characteristics on probability of success. *Int Endod J.* 2007;40(12):921-39.
6. Miller W. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. *Dent Cosmos.* 1894:505-28.
7. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965;20:340-9.
8. Siqueira JF, Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94(3):281-93.
9. Persoon IF, Crielaard W, Ozok AR. Prevalence and nature of fungi in root canal infections: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J.* 2017;50(11):1055-66.
10. Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res.* 1981;89(4):321-8.
11. Siqueira JF, Jr., Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, de Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, in vitro. *Int Endod J.* 1997;30(4):279-82.
12. Berutti E, Gagliani M. *Manuale di Endodonzia.* Milano (Italia): Edra; 2013.
13. Hargreaves KM, Berman L. *Cohen's pathways of the pulp.* Maryland Heights, Missouri: Mosby; 2015.
14. Abbott PV, Yu C. A clinical classification of the status of the pulp and the root canal system. *Aust Dent J.* 2007;52(1 Suppl):S17-31.
15. Castellucci A. *Endodonzia.* Bologna, Italia: Edizioni Martina; 1996.
16. Aw V. Discuss the role of microorganisms in the aetiology and pathogenesis of periapical disease. *Aust Endod J.* 2016;42(2):53-9.
17. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res.* 2009;88(11):969-81.
18. Santos AL, Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Jesus EC, Rosado AS, Tiedje JM. Comparing the bacterial diversity of acute and chronic dental root canal infections. *PLoS One.* 2011;6(11):e28088.
19. Bender IB, Seltzer S, Turkenkopf S. To Culture or Not to Culture? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1964;18:527-40.
20. Moller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Methodological studies.* *Odontol Tidskr.* 1966;74(5):Suppl:1-380.
21. Fouad AF. *Endodontic microbiology.* Ames, Iowa, United States: Wiley-Blackwell; 2009.
22. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol.* 1992;7(5):257-62.
23. Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(2):171-83.
24. Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, et al. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol.* 2005;20(4):211-5.
25. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003;36(1):1-11.
26. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998;31(1):1-7.
27. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85(1):86-93.
28. Hancock HH, 3rd, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91(5):579-86.
29. Kim D, Kim E. Antimicrobial effect of calcium hydroxide as an intracanal medicament in root canal treatment: a literature review - Part II. *in vivo* studies. *Restor Dent Endod.* 2015;40(2):97-103.

30. Swimberghe RCD, Coenye T, De Moor RJG, Meire MA. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. *Int Endod J.* 2019;52(5):604-28.
31. Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M, Post C, Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest.* 2003;112(10):1466-77.
32. Ramachandran Nair PN. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod.* 1987;13(1):29-39.
33. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(9):623-33.
34. Kajwadkar R, Shin JM, Lin GH, Fenno JC, Rickard AH, Kapila YL. High-purity nisin alone or in combination with sodium hypochlorite is effective against planktonic and biofilm populations of *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2017;43(6):989-94.
35. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006;32(2):93-8.
36. Ingle JI, Bakland LK, Baumgartner JC. *Ingle's endodontics* 6th Edition. Cary, North Carolina: PMPH USA; 2008.
37. Zancan RF, Canali LCF, Tartari T, Andrade FB, Vivan RR, Duarte MAH. Do different strains of *E. faecalis* have the same behavior towards intracanal medications in in vitro research? *Braz Oral Res.* 2018;32:e46.
38. Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals *ex vivo*. *Int Endod J.* 2005;38(10):735-42.
39. Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(5):308-20.
40. Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod.* 2005;31(1):30-6.
41. Soll DR. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Trop.* 2002;81(2):101-10.
42. Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Arch Oral Biol.* 1980;25(1):1-10.
43. Dupont B, Graybill JR, Armstrong D, Laroche R, Touze JE, Wheat LJ. Fungal infections in AIDS patients. *J Med Vet Mycol.* 1992;30 Suppl 1:19-28.
44. Marsh D, Lewis VM. *Oral Microbiology.* 5 ed. London: Churchill Livingstone; 2009.
45. Siqueira JF, Jr., Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97(5):632-41.
46. Waltimo TM, Sen BH, Meurman JH, Orstavik D, Haapasalo MP. Yeasts in apical periodontitis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(2):128-37.
47. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2001;9(7):327-35.
48. Hostetter MK. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev.* 1994;7(1):29-42.
49. Holmes AR, Gopal PK, Jenkinson HF. Adherence of *Candida albicans* to a cell surface polysaccharide receptor on *Streptococcus gordonii*. *Infect Immun.* 1995;63(5):1827-34.
50. Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Jr., Merz WG, Kelley JI, Baqui AA, Meiller TF. Coaggregation of *Candida dubliniensis* with *Fusobacterium nucleatum*. *J Clin Microbiol.* 1999;37(5):1464-8.
51. Hagihara Y, Kaminishi H, Cho T, Tanaka M, Kaita H. Degradation of human dentine collagen by an enzyme produced by the yeast *Candida albicans*. *Arch Oral Biol.* 1988;33(8):617-9.
52. Cotter G, Kavanagh K. Adherence mechanisms of *Candida albicans*. *Br J Biomed Sci.* 2000;57(3):241-9.
53. Calderone R, Suzuki S, Cannon R, Cho T, Boyd D, Calera J, et al. *Candida albicans*: adherence, signaling and virulence. *Med Mycol.* 2000;38 Suppl 1:125-37.
54. Kumamoto CA. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol.* 2002;5(6):608-11.
55. Danley DL, Polakoff J. Rapid killing of monocytes in vitro by *Candida albicans* yeast cells. *Infect Immun.* 1986;51(1):307-13.
56. Ogrzydziak DM. Yeast extracellular proteases. *Crit Rev Biotechnol.* 1993;13(1):1-55.
57. Dongari-Bagtzoglou A, Wen K, Lamster IB. *Candida albicans* triggers interleukin-6 and interleukin-8 responses by oral fibroblasts in vitro. *Oral Microbiol Immunol.* 1999;14(6):364-70.
58. Sen BH, Safavi KE, Spangberg LS. Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. *Arch Oral Biol.* 1997;42(7):513-20.
59. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Antibiofilm peptides against oral biofilms. *J Oral Microbiol.* 2017;9(1):1327308.
60. Magliani W, Conti S, Ciociola T, Giovati L, Zanello PP, Pertinhez T, et al. Killer peptide: a novel paradigm of antimicrobial, antiviral and immunomodulatory auto-delivering drugs. *Future Med Chem.* 2011;3(9):1209-31.
61. Fjell CD, Hiss JA, Hancock RE, Schneider G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;11(1):37-51.
62. Lima SMF, de Padua GM, Sousa M, Freire MS, Franco OL, Rezende TMB. Antimicrobial peptide-based

- treatment for endodontic infections--biotechnological innovation in endodontics. *Biotechnol Adv.* 2015;33(1):203-13.
63. Brown KL, Hancock RE. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr Opin Immunol.* 2006;18(1):24-30.
64. Durr UH, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1758(9):1408-25.
65. Steinstraesser L, Kraneburg UM, Hirsch T, Kesting M, Steinau HU, Jacobsen F, et al. Host defense peptides as effector molecules of the innate immune response: a sledgehammer for drug resistance? *Int J Mol Sci.* 2009;10(9):3951-70.
66. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 2002;415(6870):389-95.
67. Pushpanathan M, Gunasekaran P, Rajendhran J. Antimicrobial peptides: versatile biological properties. *Int J Pept.* 2013;2013:675391.
68. Utsugi T, Schroit AJ, Connor J, Bucana CD, Fidler IJ. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer Res.* 1991;51(11):3062-6.
69. de la Fuente-Nunez C, Korolik V, Bains M, Nguyen U, Breidenstein EB, Horsman S, et al. Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(5):2696-704.
70. de la Fuente-Nunez C, Reffuveille F, Mansour SC, Reckseidler-Zenteno SL, Hernandez D, Brackman G, et al. D-enantiomeric peptides that eradicate wild-type and multidrug-resistant biofilms and protect against lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Chem Biol.* 2015;22(2):196-205.
71. Jorge P, Lourenco A, Pereira MO. New trends in peptide-based anti-biofilm strategies: a review of recent achievements and bioinformatic approaches. *Biofouling.* 2012;28(10):1033-61.
72. Kim SS, Kim S, Kim E, Hyun B, Kim KK, Lee BJ. Synergistic inhibitory effect of cationic peptides and antimicrobial agents on the growth of oral streptococci. *Caries Res.* 2003;37(6):425-30.
73. Leung KP, Crowe TD, Abercrombie JJ, Molina CM, Bradshaw CJ, Jensen CL, et al. Control of oral biofilm formation by an antimicrobial decapeptide. *J Dent Res.* 2005;84(12):1172-7.
74. Wang Z, de la Fuente-Nunez C, Shen Y, Haapasalo M, Hancock RE. Treatment of oral multispecies biofilms by an anti-biofilm peptide. *PLoS One.* 2015;10(7):e0132512.
75. Hancock RE, Patrzykat A. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. *Curr Drug Targets Infect Disord.* 2002;2(1):79-83.
76. Jenssen H, Hamill P, Hancock RE. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(3):491-511.
77. de la Fuente-Nunez C, Cardoso MH, de Souza Candido E, Franco OL, Hancock RE. Synthetic antibiofilm peptides. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1858(5):1061-9.
78. Lohner K, Prenner EJ. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1462(1-2):141-56.
79. Matsuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1462(1-2):1-10.
80. Dolis D, Moreau C, Zachowski A, Devaux PF. Aminophospholipid translocase and proteins involved in transmembrane phospholipid traffic. *Biophys Chem.* 1997;68(1-3):221-31.
81. Madani F, Lindberg S, Langel U, Futaki S, Graslund A. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J Biophys.* 2011;2011:414729.
82. Peters BM, Shirtliff ME, Jabra-Rizk MA. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog.* 2010;6(10):e1001067.
83. Kondejewski LH, Jelokhani-Niaraki M, Farmer SW, Lix B, Kay CM, Sykes BD, et al. Dissociation of antimicrobial and hemolytic activities in cyclic peptide diastereomers by systematic alterations in amphipathicity. *J Biol Chem.* 1999;274(19):13181-92.
84. Magliani W, Conti S, Cunha RL, Travassos LR, Polonelli L. Antibodies as crypts of anti-infective and antitumor peptides. *Curr Med Chem.* 2009;16(18):2305-23.
85. Magliani W, Giovati L, Ciociola T, Sperinde M, Santinoli C, Conti G, et al. Antibodies as a source of anti-infective peptides: an update. *Future Microbiol.* 2015;10(7):1163-75.
86. Abraham P, Sundaram A, R A, V R, George S, Kumar KS. Structure-activity relationship and mode of action of a frog secreted antibacterial peptide B1CTcu5 using synthetically and modularly modified or deleted (SMMD) peptides. *PLoS One.* 2015;10(5):e0124210.
87. Gabrielli E, Pericolini E, Cenci E, Monari C, Magliani W, Ciociola T, et al. Antibody constant region peptides can display immunomodulatory activity through activation of the Dectin-1 signalling pathway. *PLoS One.* 2012;7(8):e43972.
88. Gabrielli E, Pericolini E, Cenci E, Ortelli F, Magliani W, Ciociola T, et al. Antibody complementarity-determining regions (CDRs): a bridge between adaptive and innate immunity. *PLoS One.* 2009;4(12):e8187.
89. Overhage J, Campisano A, Bains M, Torfs EC, Rehm BH, Hancock RE. Human host defense peptide LL-37

- prevents bacterial biofilm formation. *Infect Immun*. 2008;76(9):4176-82.
90. Polonelli L, Ciociola T, Magliani W, Zanello PP, D'Adda T, Galati S, et al. Peptides of the constant region of antibodies display fungicidal activity. *PLoS One*. 2012;7(3):e34105.
91. Polonelli L, Ponton J, Elguezabal N, Moragues MD, Casoli C, Pilotti E, et al. Antibody complementarity-determining regions (CDRs) can display differential antimicrobial, antiviral and antitumor activities. *PLoS One*. 2008;3(6):e2371.
92. Turner SR, Love RM, Lyons KM. An in-vitro investigation of the antibacterial effect of nisin in root canals and canal wall radicular dentine. *Int Endod J*. 2004;37(10):664-71.
93. Tao R, Tong Z, Lin Y, Xue Y, Wang W, Kuang R, et al. Antimicrobial and antibiofilm activity of pleurocidin against cariogenic microorganisms. *Peptides*. 2011;32(8):1748-54.
94. Lee JK, Park YJ, Kum KY, Han SH, Chang SW, Kaufman B, et al. Antimicrobial efficacy of a human beta-defensin-3 peptide using an *Enterococcus faecalis* dentine infection model. *Int Endod J*. 2013;46(5):406-12.
95. Tong Z, Ling J, Lin Z, Li X, Mu Y. The effect of MTADN on 10 *Enterococcus faecalis* isolates and biofilm: an in vitro study. *J Endod*. 2013;39(5):674-8.
96. Tong Z, Ni L, Ling J. Antibacterial peptide nisin: a potential role in the inhibition of oral pathogenic bacteria. *Peptides*. 2014;60:32-40.
97. Winfred SB, Meiyazagan G, Panda JJ, Nagendrababu V, Deivanayagam K, Chauhan VS, et al. Antimicrobial activity of cationic peptides in endodontic procedures. *Eur J Dent*. 2014;8(2):254-60.
98. Eckhard LH, Sol A, Abteu E, Shai Y, Domb AJ, Bachrach G, et al. Biohybrid polymer-antimicrobial peptide medium against *Enterococcus faecalis*. *PLoS One*. 2014;9(10):e109413.
99. Zhang T, Wang Z, Hancock RE, de la Fuente-Nunez C, Haapasalo M. Treatment of oral biofilms by a D-enantiomeric peptide. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166997.
100. Caiaffa KS, Massunari L, Danelon M, Abuna GF, Bedran TBL, Santos-Filho NA, et al. KR-12-a5 is a non-cytotoxic agent with potent antimicrobial effects against oral pathogens. *Biofouling*. 2017;33(10):807-18.
101. Lima SMF, Freire MS, Gomes ALO, Cantuaria APC, Dutra FRP, Magalhaes BS, et al. Antimicrobial and immunomodulatory activity of host defense peptides, clavansins and LL-37, in vitro: an endodontic perspective. *Peptides*. 2017;95:16-24.
102. Wang D, Shen Y, Ma J, Hancock REW, Haapasalo M. Antibiofilm effect of D-enantiomeric peptide alone and combined with EDTA In vitro. *J Endod*. 2017;43(11):1862-7.
103. Lewis MAO, Williams DW. Diagnosis and management of oral candidosis. *British dental journal*. 2017;223(9):675-81.
104. Manfredi M, Polonelli L, Aguirre-Urizar JM, Carrozzo M, McCullough MJ. Urban legends series: oral candidosis. *Oral Dis*. 2013;19(3):245-61.
105. Coleman DC, Sullivan DJ, Bennett DE, Moran GP, Barry HJ, Shanley DB. Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. *AIDS*. 1997;11(5):557-67.
106. Pereira D, Seneviratne CJ, Koga-Ito CY, Samaranyake LP. Is the oral fungal pathogen *Candida albicans* a cariogen? *Oral Dis*. 2017.
107. Sardi JC, Duque C, Mariano FS, Peixoto IT, Hofling JF, Goncalves RB. *Candida* spp. in periodontal disease: a brief review. *J Oral Sci*. 2010;52(2):177-85.
108. Persoon IF, Buijs MJ, Ozok AR, Crielaard W, Krom BP, Zaura E, et al. The mycobiome of root canal infections is correlated to the bacteriome. *Clin Oral Investig*. 2017;21(5):1871-81.
109. Munn Z, Moola S, Lisy K, Riitano D, Tufanaru C. Joanna Briggs Institute Reviewer's Manual. The Joanna Briggs Institute; 2017.
110. Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, Elmagarmid A. Rayyan-a web and mobile app for systematic reviews. *Syst Rev*. 2016;5(1):210.
111. Munn Z, Moola S, Riitano D, Lisy K. The development of a critical appraisal tool for use in systematic reviews addressing questions of prevalence. *Int J Health Policy Manag*. 2014;3(3):123-8.
112. Daniel WW, Cross CL. *Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences*, 10th Edition 2013.
113. DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials*. 1986;7(3):177-88.
114. Dear KBG, Begg CB. An approach for assessing publication bias prior to performing a meta-analysis. *Statistical Science*. 1992:237-45.
115. Sterne JA, Gavaghan D, Egger M. Publication and related bias in meta-analysis: power of statistical tests and prevalence in the literature. *J Clin Epidemiol*. 2000;53(11):1119-29.
116. Möller AJR. *Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth - Section B* (PhD thesis). Göteborg, Sweden: University of Göteborg; 1966.
117. Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *J Endod*. 2000;26(12):695-8.
118. Baumotte K, Bombana AC, Cai S. Microbiologic endodontic status of young traumatized tooth. *Dent Traumatol*. 2011;27(6):438-41.

119. Brito LC, Sobrinho AP, Teles RP, Socransky SS, Haffajee AD, Vieira LQ, et al. Microbiologic profile of endodontic infections from HIV- and HIV+ patients using multiple-displacement amplification and checkerboard DNA-DNA hybridization. *Oral Dis.* 2012;18(6):558-67.
120. Chakraborty P, Chattopadhyay UK. A study on the polymicrobial etiology of root canal infections in anterior non-vital teeth in a government hospital in Kolkata, India. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2005;9(2):113-6.
121. Chu FC, Tsang CS, Chow TW, Samaranayake LP. Identification of cultivable microorganisms from primary endodontic infections with exposed and unexposed pulp space. *J Endod.* 2005;31(6):424-9.
122. Cogulu D, Uzel A, Oncag O, Eronat C. PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in deciduous and permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106(3):443-9.
123. de Miranda RG, Colombo APV. Clinical and microbiological effectiveness of photodynamic therapy on primary endodontic infections: a 6-month randomized clinical trial. *Clin Oral Investig.* 2017.
124. Ferenczi I, Szabo K, Felkai G. Yeasts fungi in gangrenous root canals. *Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl.* 1983;71(8):796-8.
125. Ferrari PH, Cai S, Bombana AC. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. *Int Endod J.* 2005;38(6):372-80.
126. Ferrari PHP. Detecção de microrganismos oportunistas em pacientes soropositivos para o HIV e portadores de infecção endodôntica primária (PhD thesis). São Paulo, Brazil: Universidade de São Paulo.; 2004.
127. Kaur A, Soodan PS, Soodan KS, Pruyadarshni P. Evaluation of prevalence of *Candida* species in the root canals and oral cavity of children and adult patients. *Journal of Dental and Medical Sciences.* 2014;13(7):100-4.
128. Kessler S. Bacteriological examination of root canals. *J Dent Assoc S Afr.* 1972;27(1):9-13.
129. Kubo CH, Gomes APM, Jorge AOC. Isolating *Candida* from root canal and assessing its sensitivity to medication used in endodontic therapy. *Revista de Odontologia da UNICID.* 1997;9(2):119-30.
130. Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, Garcia GD, Silva BK, Hamdan JS, et al. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. *Oral Microbiol Immunol.* 2001;16(2):100-5.
131. Matusow RJ. Acute pulpal-aleveolar cellulitis syndrome. I. Clinical study of bacterial isolates from pulps and exudates of intact teeth, with description of a specific culture technique. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1979;48(1):70-6.
132. Miranda TT, Vianna CR, Rodrigues L, Monteiro AS, Rosa CA, Correa A, Jr. Diversity and frequency of yeasts from the dorsum of the tongue and necrotic root canals associated with primary apical periodontitis. *Int Endod J.* 2009;42(9):839-44.
133. Molander A, Reit C, Dahlen G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide in root canals pretreated with 5% iodine potassium iodide. *Endod Dent Traumatol.* 1999;15(5):205-9.
134. Nastri N, Nastri M, Jewtuchowicz V, Mujica M, Lovanniti C, Gualtieri A, et al. Prevalence of *Candida* species in necrotic pulp with chronic periapical processes. *Acta Odontol Latinoam.* 2011;24(2):183-7.
135. Ndiaye D, Diongue K, Bane K, Niang SO, Ndiaye D, Toure B. Presence of yeasts in primary endodontic infections and study of their susceptibility to disinfection with sodium hypochlorite at 2.5%. *J Mycol Med.* 2016;26(2):111-5.
136. Ogude GO, Akerele JO. Incidence of fungi pathogens associated with root canal treatments, in Benin City, Nigeria. *Trop Doct.* 2005;35(4):219-20.
137. Paiva SS, Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Carmo FL, Ferreira DC, Curvelo JA, et al. Supplementing the antimicrobial effects of chemomechanical debridement with either passive ultrasonic irrigation or a final rinse with chlorhexidine: a clinical study. *J Endod.* 2012;38(9):1202-6.
138. Pupo Marrugo S, Alvear Pérez J, Díaz Caballero AJ. Identification of *Candida* Species in patients with chronic apical periodontitis non suppurative. *Acta Odontológica Venezolana.* 2012;50(1).
139. Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Comparison of the *in vivo* antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: a molecular microbiology study. *J Endod.* 2011;37(2):143-50.
140. Rocas IN, Siqueira JF, Jr. *In vivo* antimicrobial effects of endodontic treatment procedures as assessed by molecular microbiologic techniques. *J Endod.* 2011;37(3):304-10.
141. Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps (PhD thesis). Umeå, Sweden: University of Umeå; 1976.
142. Tommasi AF. Frequency of yeasts in root canals. Study of their removable by biomechanical methods. *Revista da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo* 1969;7(2):363-401.
143. Tsang CSP, Chu FCS, Samaranayake LP. Detection of *Treponema*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, and *Candida* species in root canal infections in southern Chinese (Abstract). *Journal of Dental Research.* 2003;82:B125.
144. Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Orstavik D. Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. *J Endod.* 2005;31(12):863-6.
145. Anderson AC, Hellwig E, Vespermann R, Wittmer A, Schmid M, Karygianni L, et al. Comprehensive analysis

- of secondary dental root canal infections: a combination of culture and culture-independent approaches reveals new insights. *PLoS One*. 2012;7(11):e49576.
146. Ashraf H, Samiee M, Eslami G, Ghodse Hosseini MR. Presence of *Candida Albicans* in root canal system of teeth requiring endodontic retreatment with and without periapical lesions. *Iran Endod J*. 2007;2(1):24-8.
147. Cheung GS, Ho MW. Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiol Immunol*. 2001;16(6):332-7.
148. Karygianni L, Anderson AC, Tennert C, Kollmar K, Altenburger MJ, Hellwig E, et al. Supplementary sampling of obturation materials enhances microbial analysis of endodontic treatment failures: a proof of principle study. *Clin Oral Investig*. 2015;19(2):319-27.
149. Mindere A, Kundzina R, Nikolajeva V, Eze D, Petrina Z. Microflora of root filled teeth with apical periodontitis in Latvian patients. *Stomatologija*. 2010;12(4):116-21.
150. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J*. 2001;34(6):429-34.
151. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18(2):100-3.
152. Poptani B, Sharaff M, Archana G, Parekh V. Detection of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in previously root-filled teeth in a population of Gujarat with polymerase chain reaction. *Contemp Clin Dent*. 2013;4(1):62-6.
153. Pourhajibagher M, Ghorbanzadeh R, Parker S, Chiniforush N, Bahador A. The evaluation of cultivable microbiota profile in patients with secondary endodontic infection before and after photo-activated disinfection. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017;18:198-203.
154. Rocas IN, Hulsmann M, Siqueira JF, Jr. Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. *J Endod*. 2008;34(8):926-31.
155. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;97(1):85-94.
156. Dumani A, Yoldas O, Yilmaz S, Koksall F, Kayar B, Akcimen B, et al. Polymerase chain reaction of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in apical periodontitis from Turkish patients. *J Clin Exp Dent*. 2012;4(1):e34-9.
157. Egan MW, Spratt DA, Ng YL, Lam JM, Moles DR, Gulabivala K. Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. *Int Endod J*. 2002;35(4):321-9.
158. Ercan E, Dalli M, Yavuz I, Özekinci T. Investigation of microorganisms in infected dental root canals. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2006;20(2):166-72.
159. Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 2004;19(2):71-6.
160. Lysakowska ME, Ciebiada-Adamiec A, Sienkiewicz M, Sokolowski 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;49(5):422-30.
161. Petit C, Weber M, Burdin JC. Bacterial flora of canals of untreated teeth. *Odontol Conserv*. 1974;1:39-49.
162. Möller AJR. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth - Section A (PhD thesis). Göteborg, Sweden: University of Göteborg; 1966.
163. Crawford JJ, Shankle RJ. Application of newer methods to study the importance of root canal and oral microbiota in endodontics. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1961;14:1109-23.
164. Diaz C, Zillmann G, Huerta J. Correlation between the presence of *Candida* species in saliva and in necrotic root canals – preliminary study (Abstract). *Journal of Dental Research*. 1995;74:901.
165. Gomes CC, Guimaraes LS, Pinto LCC, Camargo G, Valente MIB, Sarquis MIM. Investigations of the prevalence and virulence of *Candida albicans* in periodontal and endodontic lesions in diabetic and normoglycemic patients. *J Appl Oral Sci*. 2017;25(3):274-81.
166. Najzar-Fleger D. The incidence of *Candida* and *Rhodotorula* in the root canal. *Acta Stomatol Croat*. 1969;4(4):174-80.
167. Zbidi ND, Zaki A, Zouiten S, Boughzala A, Baccouche C. Prevalence of endodontic yeasts in periapical infections. *Odontostomatol Trop*. 2005;28(110):5-12.
168. Chu FC, Leung WK, Tsang PC, Chow TW, Samaranyake LP. Identification of cultivable microorganisms from root canals with apical periodontitis following two-visit endodontic treatment with antibiotics/steroid or calcium hydroxide dressings. *J Endod*. 2006;32(1):17-23.
169. Seltzer S, Bender IB. Antibiotics in the treatment of yeastlike infections of the root canal. *J Am Dent Assoc*. 1950;41(3):295-301.
170. Slack G. The bacteriology of infected root canals and *in vitro* penicillin sensitivity. *British dental journal*. 1953;3:211-14.

171. Bartels HA, Buchbinder M. Yeastlike microorganisms isolated from root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1954;7(1):98-102.
172. Slack G. The resistance to antibiotics of microorganisms isolated from root canals. *British dental journal.* 1957;18:493-4.
173. Macdonald JB, Hare GC, Wood AW. The bacteriologic status of the pulp chambers in intact teeth found to be nonvital following trauma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1957;10(3):318-22.
174. Hobson P. An investigation into the bacteriological control of infected root canals. *British dental journal.* 1959;20:63-70.
175. Jackson F, Halder A. Incidence of yeasts in root canals during therapy. *British dental journal.* 1963;115:459-60.
176. Engstrom B, Frostell G. Experiences of bacteriological root canal control. *Acta Odontol Scand.* 1964;22:43-69.
177. Nyarady J. Fungal structures in dentin, dental pulp and granuloma. (Preliminary Report). *Fogorv Sz.* 1965;58:111-2.
178. Wilson MI, Hall J. Incidence of yeasts in root canals. *J Br Endod Soc.* 1968;2(4):56-9.
179. Goldman M, Pearson AH. Postdebridement bacterial flora and antibiotic sensitivity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1969;28(6):897-905.
180. Najzar-Fleger D, Pavelic L. Seasonal incidence of yeastlike fungi in the root canal. *Acta Stomatol Croat.* 1971;6(2):93-7.
181. Borea G, Spina D. Bacteriological studies of the bacterial flora of acute dental infections. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 1974;50(18):1429-32.
182. Akpata ES. Total viable count of microorganisms in the infected dental pulp. *J Dent Res.* 1974;53(6):1330-3.
183. Tinkl S, Roman I, Rusu O, Purge DG. Clinical and microbiological observations in the antibiotic therapy of pulp gangrene. *Rev Chir Oncol Radiol O R L Oftalmol Stomatol Ser Stomatol.* 1975;22(3):183-8.
184. Ferenczi I, Szabo K, Felkai G. Incidence of *Candida* in gangrenous root canals. *Fogorv Sz.* 1979;72(9):276-8.
185. Matusow RJ. Acute pulpal-alveolar cellulitis syndrome. III. Endodontic therapeutic factors and the resolution of a *Candida albicans* infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1981;52(6):630-4.
186. Nair PN, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod.* 1990;16(12):580-8.
187. Pepe RR, Bertolotto C. The first isolation of *Torulopsis glabrata* (Anderson) Lodder from dental granulomas. *Minerva Stomatol.* 1992;41(10):431-4.
188. Najzar-Fleger D, Filipovic D, Prpic G, Kobler D. *Candida* in root canal in accordance with oral ecology (Abstract). *European Society of Endodontology Conference 1992.*
189. Drozdova RK, Rekhachev VM, Vinogradova IE, Suborova TN. The evaluation of the root canal microflora in periapical periodontitis in Saint-Petersburg residents in different years. *Stomatologija (Mosk).* 1996;Spec No:53-4.
190. Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J.* 1997;30(2):91-5.
191. Waltimo TM, Siren EK, Torkko HL, Olsen I, Haapasalo MP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997;30(2):96-101.
192. Watts CM, Baumgartner JC, Xia T. Detection of *Candida albicans* in infected root canals using PCR. *J Dent Res.* 2000;79:157.
193. Waltimo TMT, Ørstavik D, Samaranayake LP, Haapasalo MPP. *Candida albicans* biotypes in persistent root canal infections in a Finnish population. *J Dent Res.* 2000;79:476.
194. Waltimo TM, Dassanayake RS, Ørstavik D, Haapasalo MP, Samaranayake LP. Phenotypes and randomly amplified polymorphic DNA profiles of *Candida albicans* isolates from root canal infections in a Finnish population. *Oral Microbiol Immunol.* 2001;16(2):106-12.
195. Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod.* 2002;28(4):304-10.
196. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Lopes HP. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;93(2):174-8.
197. Cassandrum A, Gatti M, Baram C, Prati C. Occurrence of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in root canal infections. *J Dent Res.* 2002;81:B268.
198. Akdeniz BG, Koparal E, Sen BH, Ates M, Denizci AA. Prevalence of *Candida albicans* in oral cavities and root canals of children. *ASDC J Dent Child.* 2002;69(3):289-92, 35.
199. Waltimo T, Kuusinen M, Jarvensivu A, Nyberg P, Vaananen A, Richardson M, et al. Examination on *Candida* spp. in refractory periapical granulomas. *Int Endod J.* 2003;36(9):643-7.
200. Adib V, Spratt D, Ng YL, Gulabivala K. Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. *Int Endod J.* 2004;37(8):542-51.
201. Lacevic A, Bilalovic N, Kapic A. Bacterial aggregation in infected root canal. *Bosn J Basic Med Sci.* 2005;5(4):35-9.

202. Rossi-Fedele G, Scott W, Spratt D, Gulabivala K, Roberts AP. Incidence and behaviour of Tn916-like elements within tetracycline-resistant bacteria isolated from root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 2006;21(4):218-22.
203. Rodriguez P, Calero JA. Pulp microbiology of complete teeth with idiopathic apical lesions. *Colombia Médica*. 2008;39(1):5-10.
204. Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23(5):384-90.
205. Zhang S, Wang QQ, Zhang CF, Soo I. Identification of dominant pathogens in periapical lesions associated with persistent apical periodontitis. *Chin J Dent Res*. 2010;13(2):115-21.
206. Gomes C, Fidel S, Fidel R, de Moura Sarquis MI. Isolation and taxonomy of filamentous fungi in endodontic infections. *J Endod*. 2010;36(4):626-9.
207. Al-Ahmad A, Vespermann R, Wittmer A, Hellwig E, Anderson A. Diversity of the endodontic microbiota of infected root-filled teeth with periradicular lesions. 64th Annual Meeting of the German-Society-for-Hygiene-and-Microbiology2012. p. 47.
208. Teles AM, Manso MC, Loureiro S, Silva R, Madeira I, Pina C, et al. Identification of yeast and non-pigmented cultivable endodontic bacteria in adult Portuguese patients. In: Méndez-Vilas A, editor. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*2013.
209. Signoretti FG, Gomes BP, Montagner F, Jacinto RC. Investigation of cultivable bacteria isolated from longstanding retreatment-resistant lesions of teeth with apical periodontitis. *J Endod*. 2013;39(10):1240-4.
210. Kovac J, Kovac D, Slobodnikova L, Kotulova D. *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in the dental root canal and periapical infections. *Bratisl Lek Listy*. 2013;114(12):716-20.
211. 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;48(8):717-28.
212. Kumar J, Sharma R, Sharma M, Prabhavathi V, Paul J, Chowdary CD. Presence of *Candida albicans* in root canals of teeth with apical periodontitis and evaluation of their possible role in failure of endodontic treatment. *J Int Oral Health*. 2015;7(2):42-5.
213. Asnaashari M, Homayuni H, Paymanpour P. The antibacterial effect of additional photodynamic therapy in failed endodontically treated teeth: a pilot study. *J Lasers Med Sci*. 2016;7(4):238-42.
214. Henriques LC, de Brito LC, Tavares WL, Teles RP, Vieira LQ, Teles FR, et al. Microbial ecosystem analysis in root canal infections refractory to endodontic treatment. *J Endod*. 2016;42(8):1239-45.
215. Sundaram D, Narayanan RK, Vadakkepurayil K. A comparative evaluation on antimicrobial effect of honey, neem leaf extract and sodium hypochlorite as intracanal irrigant: an *ex-vivo* study. *J Clin Diagn Res*. 2016;10(8):ZC88-91.
216. Ramkumar SRS, Sivakumar N, Angelo JBMC. Effect of *Garcinia Imberti* Bourd against *Candida* isolates in root canal infection. *J Young Pharm*. 2017;9(2):214-7.
217. Narayanan LL, Vaishnavi C. Endodontic microbiology. *J Conserv Dent*. 2010;13(4):233-9.
218. Wang H, Xu J, Guo H, Wu J, Yi G, Pei H, et al. Patterns of human oral yeast species distribution on Hainan Island in China. *Mycopathologia*. 2013;176(5-6):359-68.
219. Lydia Rajakumari M, Saravana Kumari P. Prevalence of *Candida* species in the buccal cavity of diabetic and non-diabetic individuals in and around Pondicherry. *J Mycol Med*. 2016;26(4):359-67.
220. Baumgartner JC, Siqueira JF, Jr., Xia T, Rocas IN. Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. *J Endod*. 2004;30(3):141-4.
221. Rocas IN, Baumgartner JC, Xia T, Siqueira JF, Jr. Prevalence of selected bacterial named species and uncultivated phylotypes in endodontic abscesses from two geographic locations. *J Endod*. 2006;32(12):1135-8.
222. Siqueira JF, Jung IY, Rocas IN, Lee CY. Differences in prevalence of selected bacterial species in primary endodontic infections from two distinct geographic locations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;99(5):641-7.
223. Al Khalaf MM, Thalib L, Doi SA. Combining heterogenous studies using the random-effects model is a mistake and leads to inconclusive meta-analyses. *J Clin Epidemiol*. 2011;64(2):119-23.
224. Borenstein M, Hedges LV, Higgins JPT, Rothstein HR. *Introduction to Meta-Analysis*. Chichester (UK): John Wiley & Sons, Ltd 2009. 149-86 p.
225. Rao G, Lopez-Jimenez F, Boyd J, D'Amico F, Durant NH, Hlatky MA, et al. Methodological standards for meta-analyses and qualitative systematic reviews of cardiac prevention and treatment studies: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2017;136(10):e172-e94.
226. Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J*. 1985;18(1):35-40.
227. Siqueira JF, Jr., Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J*. 1999;32(5):361-9.
228. Wang JD, Hume WR. Diffusion of hydrogen ion and hydroxyl ion from various sources through dentine. *Int Endod J*. 1988;21(1):17-26.

229. Siqueira JF, Jr., de Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod.* 1996;22(12):674-6.
230. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod.* 2002;28(10):689-93.
231. Marr AK, Gooderham WJ, Hancock RE. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr Opin Pharmacol.* 2006;6(5):468-72.
232. Wimley WC, Hristova K. Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions. *J Membr Biol.* 2011;239(1-2):27-34.
233. Rogers LA, Whittier EO. Limiting factors in the lactic fermentation. *J Bacteriol.* 1928;16(4):211-29.
234. Tjabringa GS, Rabe KF, Hiemstra PS. The human cathelicidin LL-37: a multifunctional peptide involved in infection and inflammation in the lung. *Pulm Pharmacol Ther.* 2005;18(5):321-7.
235. Paulone S, Ardizzoni A, Tavanti A, Piccinelli S, Rizzato C, Lupetti A, et al. The synthetic killer peptide KP impairs *Candida albicans* biofilm in vitro. *PLoS One.* 2017;12(7):e0181278.
236. Magliani W, Conti S, Travassos LR, Polonelli L. From yeast killer toxins to antibiobodies and beyond. *FEMS Microbiol Lett.* 2008;288(1):1-8.
237. Casoli C, Pilotti E, Perno CF, Balestra E, Polverini E, Cassone A, et al. A killer mimotope with therapeutic activity against AIDS-related opportunistic micro-organisms inhibits *ex-vivo* HIV-1 replication. *AIDS.* 2006;20(7):975-80.
238. Conti G, Magliani W, Conti S, Nencioni L, Sgarbanti R, Palamara AT, et al. Therapeutic activity of an anti-idiotypic antibody-derived killer peptide against influenza A virus experimental infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(12):4331-7.
239. Fiori PL, Mattana A, Dessi D, Conti S, Magliani W, Polonelli L. In vitro acanthamoebicidal activity of a killer monoclonal antibody and a synthetic peptide. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(5):891-8.
240. Giovati L, Santinoli C, Mangia C, Vismarra A, Belletti S, D'Adda T, et al. Novel activity of a synthetic decapeptide against *Toxoplasma gondii* Tachyzoites. *Front Microbiol.* 2018;9:753.
241. Savoia D, Scutera S, Raimondo S, Conti S, Magliani W, Polonelli L. Activity of an engineered synthetic killer peptide on *Leishmania major* and *Leishmania infantum* promastigotes. *Exp Parasitol.* 2006;113(3):186-92.
242. Polonelli L, Ciociola T, Sperinde M, Giovati L, D'Adda T, Galati S, et al. Fungicidal activity of peptides encoded by immunoglobulin genes. *Sci Rep.* 2017;7(1):10896.
243. Lagori G, Fornaini C, Rocca JP, Merigo E. Use of photo-Fenton's reaction by 400-nm LED light for endodontic disinfection: A preliminary in vitro study on *Enterococcus faecalis*. *J Photochem Photobiol B.* 2017;171:85-9.
244. Hermann BW. Calciumhydroxyd Als Mittel Zum Behandeln und Füllen Von Zahnwurzelkanälen. *Würzburg, Med Diss.* 1920;29.
245. Zancan RF, Vivan RR, Milanda Lopes MR, Weckwerth PH, de Andrade FB, Ponce JB, et al. Antimicrobial activity and physicochemical properties of calcium hydroxide pastes used as intracanal medication. *J Endod.* 2016;42(12):1822-8.
246. Dianat O, Azadnia S, Mozayeni MA. Toxicity of calcium hydroxide nanoparticles on murine fibroblast cell line. *Iran Endod J.* 2015;10(1):49-54.
247. Gillies RJ, Didier N, Denton M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem.* 1986;159(1):109-13.
248. Basrani B, Santos JM, Tjaderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J, et al. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94(2):240-5.
249. Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J.* 2003;36(4):267-75.
250. Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod.* 2011;37(10):1380-5.
251. Minsky M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning.* 1988;10:128-38.
252. Nguyen JNT, Harbison AM. Scanning electron microscopy sample preparation and imaging. *Methods Mol Biol.* 2017;1606:71-84.
253. Hsiao WW, Li KL, Liu Z, Jones C, Fraser-Liggett CM, Fouad AF. Microbial transformation from normal oral microbiota to acute endodontic infections. *BMC Genomics.* 2012;13:345.
254. Lamont RJ, Hajishengallis G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends Mol Med.* 2015;21(3):172-83.
255. Jorth P, Turner KH, Gumus P, Nizam N, Buduneli N, Whiteley M. Metatranscriptomics of the human oral microbiome during health and disease. *MBio.* 2014;5(2):e01012-14.
256. Whitworth JM. Apparent periapical repair without operative intervention: a case report and discussion. *Int Endod J.* 2000;33(3):286-9.
257. Jenkinson HF, Lala HC, Shepherd MG. Coaggregation of *Streptococcus sanguis* and other streptococci with *Candida albicans*. *Infect Immun.* 1990;58(5):1429-36.
258. Willems HM, Kos K, Jabra-Rizk MA, Krom BP. *Candida albicans* in oral biofilms could prevent caries. *Pathog*

Dis. 2016;74(5).

259. Xu H, Sobue T, Thompson A, Xie Z, Poon K, Ricker A, et al. Streptococcal co-infection augments *Candida* pathogenicity by amplifying the mucosal inflammatory response. *Cell Microbiol.* 2014;16(2):214-31.

260. Ifrim DC, Quintin J, Joosten LA, Jacobs C, Jansen T, Jacobs L, et al. Trained immunity or tolerance: opposing functional programs induced in human monocytes after engagement of various pattern recognition receptors. *Clin Vaccine Immunol.* 2014;21(4):534-45.

261. Segura-Egea JJ, Martin-Gonzalez J, Castellanos-Cosano L. Endodontic medicine: connections between apical periodontitis and systemic diseases. *Int Endod J.* 2015;48(10):933-51.

262. Peters LB, Wesselink PR. Periapical healing of endodontically treated teeth in one and two visits obturated in the presence or absence of detectable microorganisms. *Int Endod J.* 2002;35(8):660-7.

263. Gokhale SR, Padhye AM. Future prospects of systemic host modulatory agents in periodontal therapy. *Br Dent J.* 2013;214(9):467-71.

264. Kirkevang LL, Vaeth M, Wenzel A. Ten-year follow-up of root filled teeth: a radiographic study of a Danish population. *Int Endod J.* 2014;47(10):980-8.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare profondamente la Prof.ssa Manfredi per aver avuto fiducia in me e per avermi seguito, pazientemente e generosamente, nel campo della Medicina Orale e, più recentemente, nel mio percorso universitario nell'ambito dell'Endodonzia.

Ringrazio la dott.ssa Laura Giovati per aver supervisionato ogni aspetto degli esperimenti di laboratorio. La ringrazio inoltre per la benevolenza che mi ha sempre dimostrato e per l'esempio di serietà e dedizione al lavoro. Ringrazio la prof.ssa Stefania Conti, la dott.ssa Tecla Ciociola e la dott.ssa Erika Cirrone per avermi dato la possibilità di lavorare nel loro gruppo di ricerca.

Ringrazio la dott.ssa Silvana Belletti per l'analisi al microscopio confocale a scansione laser, il Sig. Davide Dallatana per le valutazioni al microscopio elettronico a scansione, la dott.ssa Daniela Percudani per l'elaborazione della strategia di ricerca della revisione sistematica, la dott.ssa Francesca Poggia e Chiara Mirabile per aver collaborato alle sperimentazioni *in vitro*, il dott. Daniele Catalano per il lavoro inerente alla selezione degli articoli e all'estrazione dei dati. Ringrazio infine il dott. Giuseppe Lagori per averci fornito i dischetti di idrossiapatite.