



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**  
**FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

***“EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOFILM SOBRE LAS  
SUPERFICIES DE LOS MATERIALES BIO-CERÁMICOS, MTA Y  
BIODENTINE: ESTUDIO IN VITRO”***

**C.D. Alejandra Ruiz Flores**

Tesis Para Optar El Título De Maestra En Ciencias Odontológicas Integral Avanzada

---

FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA, U.A.S.L.P, SAN LUIS POTOSÍ, MEX.  
TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS.

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P., MÉXICO, JUNIO 2021



**“EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOFILM SOBRE LAS SUPERFICIES DE LOS MATERIALES BIO-CERÁMICOS, MTA Y BIODENTINE: ESTUDIO IN VITRO”**

**C.D. Alejandra Ruiz Flores**

Tesis Para Optar El Título De Maestra En Ciencias Odontológicas Integral Avanzada

---

FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA, U.A.S.L.P, SAN LUIS POTOSÍ, MEX.

TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS.

DIRECTOR.....Francisco J. Gutiérrez Cantú, PhD

ASESOR.....Ana María González Amaro, M.C

ASESOR..... Abraham Israel Muñoz Ruiz, PhD.

ASESOR.....Rita E. Martínez Martínez , PhD

JUNIO 2021



*Evaluación de la formación de biofilm sobre las superficies de los materiales bio-cerámicos, MTA y biodentine: estudio en vitro* por *Alejandra Ruiz Flores* se distribuye bajo una [licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

## **DEDICATORIA**

*A mi familia, el pilar de todas mis batallas.*

## ***Agradecimientos***

A Dios por estar en cada paso que doy.

A mis padres, por crear la persona que soy, darme la oportunidad de una mejor educación, siempre estaré en deuda.

Dr. Abraham Muñoz por toda la paciencia y el tiempo que se tomó para estar ahí para mí, como maestro y amigo.

Dra. Ana María Glz. Por ser la alegría y la sabiduría en mi fase experimental, gracias por todas las cosas que me ha enseñado.

Selene por todo la paciencia y conocimiento en el laboratorio y por todos los consejos de vida.

Ascana por darme el apoyo y la paciencia en cada paso del camino y ser la paz que necesitaba cada vez que me derrumbé, haz estado hasta el final desde que esto empezó.

Noe por ser mi casa, amiga, terapeuta, psicóloga, hermana y siempre aguantarme.

Mis profesores por motivarme a mejorar y me darme las herramientas para una mejor práctica odontológica.

A mis compañeros de la maestría que recorrimos este camino juntos y en donde me hicieron sentir bienvenida y en casa.

A la casa comercial Septdont que sin su apoyo no se hubiera logrado esta investigación.

A la Maestría en Endodoncia y Doctorado en Ciencias Odontológicas de la UASLP, por abrirme sus puertas y su apoyo con conocimientos e instalaciones en esta investigación.

**“EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOFILM SOBRE LAS SUPERFICIES DE MATERIALES BIO-CERÁMICOS POSTERIOR A LA RETRO-OBTURACIÓN: ESTUDIO IN VITRO”**

**Alejandra Ruiz Flores**

Facultad De Estomatología, UASLP.  
Maestría En Odontología Integral Avanzada

**Objetivo:** Evaluar la presencia de formación de biopelícula de *E. faecalis* sobre la superficie de MTA Gris, MTA Blanco y Biodentine In Vitro

**Métodos:** Se utilizaron 37 dientes premolares uni-radicales extraídos por motivos de ortodoncia los cuales de cada uno de ellos se obtuvieron 3 discos de dentina de cada raíz, con los cuales se realizó una fase preclínica que involucro, corte, limpieza y desinfección de las muestras, al igual que su obturación con los distintos materiales biocerámicos, MTA Gris (Angelus), MTA Blanco (Angelus) Y Biodentine (Septodont). En la fase microbiológica se formó biofilm de *E. faecalis* (método laminar y bajo estrés alimenticio) sobre los discos de dentina obturados durante 21 días, realizando recambios del medio de cultivo cada 48 hrs. Se realizó la preparación de las muestras para la lectura en el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB), las cuales consisten de fijación, deshidratación, secado en punto crítico y cobertura en baño de oro. Se realizó la lectura en diferentes magnificaciones de 20x, 2500x, 5000x, sobre la superficie del material y la interfaz de este con la dentina.

**Resultados:** En los tres materiales de retro-obturación se encontró y observó las etapas de formación de Biofilm, la cual confirma que a pesar de que en una cirugía apical se obture con alguno de estos materiales con propiedad antimicrobianas, puede llegar a continuar una infección persistente ya que si puede llegar a crearse Biofilm sobre sus superficies.

**Conclusiones:** La limpieza de cualquier superficie dental, ya sea radicular o extra radicular debe de ser la principal preocupación de un odontólogo para el éxito de nuestro tratamiento contra los microorganismos.

**Palabras Clave:** Biofilm, *E. faecalis*, MTA Gris, MTA Blanco, Biodentine

## INDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
MARCO TEORICO .....	3
Terapia Pulpar.....	3
Tratamiento radicular no quirurgico.....	5
Tratamiento Radicular Quirúrgico .....	7
Biocerámicos.....	11
Mineral Trióxido Agregado .....	11
Biodentine.....	15
Microbiología.....	17
Biofilm/ Biopelícula Bacteriana .....	17
Cultivo Bacteriano .....	21
Microscopio Electrónico de Barrido.....	23
JUSTIFICACIÓN .....	25
Pregunta de Investigación.....	25
OBJETIVOS.....	26
Objetivo General .....	26
Objetivos específicos.....	26

<b>HIPÓTESIS</b> .....	27
<b>METODOLOGÍA</b> .....	28
<b>Lugar de estudio</b> .....	28
<b>Diseño del estudio</b> .....	28
<b>Criterios de selección de la muestra</b> .....	28
Criterios de inclusión de la muestra.....	28
<b>Criterios de exclusión de muestra</b> .....	28
<b>Criterios de eliminación de muestra</b> .....	28
<b>Variables</b> .....	29
<b>Consideraciones Éticas</b> .....	30
<b>Fase Experimental</b> .....	31
<b>Primera Fase: Pre-Clínica</b> .....	32
<b>Segunda Fase: Microbiológica</b> .....	34
<b>Reactivación de la Cepa de <i>E. faecalis</i></b> .....	34
<b>Formacion de Biofilm por Método Estático</b> .....	35
<b>Tercera Fase: Microscopio electrónico de barrido</b> .....	37



<b>Resultados</b> .....	39
<b>Discusión</b> .....	54
<b>Conclusiones</b> .....	59
<b>Perspectivas</b> .....	60
<b>Bibliografía</b> .....	61
<b>ANEXO 1</b> .....	69
<b>ANEXO 2</b> .....	76



## INTRODUCCIÓN

La endodoncia es el campo de la odontología que se encarga del estudio de la morfología, fisiología y patología de la pulpa dental, al igual que los tejidos circundantes a ella o "peri-radicales". El estudio de la pulpa involucra la biología y fisiología de una pulpa sana y enferma; dentro de esta se puede evaluar su diagnóstico, etiología, prevención y cuidados, al igual que su tratamiento. La pulpa dental es un tejido conectivo altamente vascularizado e innervado que se encuentra rodeado de tejido mineralizado como es la dentina y esmalte, fungen distintas funciones y actividades como son formativas, protectoras, nutritivas y reparadoras, además aporta vitalidad al diente, suministrada a través del foramen por vasos sanguíneos, nervios y células inmunes (linfocitos, macrófagos, etc.) (Hargreaves KM, 2011; Morotomi, Washio, & Kitamura, 2019)(Seltzer, Bender, & Ziontz, 1963)

Se ha visto la práctica de la endodoncia desde el año 200 a. C., el tratamiento de conducto más antiguo se informó en el cráneo de un guerrero Nabateo y se rellenó con un alambre de bronce; En el 668 a. C se encontró un Papiro sugiriendo la "Teoría del Gusano", que estaba planteando la caries dental, para lo cual se realizó un tratamiento de conducto con metal; posterior a esto en el Siglo I se comenzó a practicar la endodoncia de manera empírica cuando Arquígenes describe la extirpación de la pulpa. En 1684 Antonie Van Leeuwenhoek fue el primero de hablar de microorganismos en dientes, pero fue hasta 1728 que Pierre Fauchard presentó su libro "El Cirujano Dentista" con nuevos conceptos y manejo de emergencias del diente, describiendo a esta patología como "dientes enfermos y con dolor por caries". En 1728 John Hunter habla de la una teoría de llegar a patologías en lugares donde no se podía ver. En 1876 Witzel impregnaba la pulpa con fenol para su limpieza, y con esto en 1900 W. Miller comprobó la existencia de microorganismos en el interior del diente, comenzando así estudios con microorganismos específicos como el *Enterococcus*, observando que en el 96% de los casos estos estuvieron presentes. En 1912 Fisher publicó el primer estudio de la anatomía del conducto radicular. En 1943 se formó la Asociación Estadounidense de Endodoncia y no fue hasta 1963 que se reconoció la endodoncia como especialidad dental. (Aliuddin et al., 2017; Hargreaves KM, 2011)

La pulpa dental es un tejido conectivo la cual su patogénesis involucra distintos daños o lesiones pulpares, los cuales pueden ser mejor entendidos con una anamnesis adecuada, realizando pruebas de vitalidad, sondeo periodontal, toma de radiografías y planeación protésica, todos estos parámetros nos pueden ayudar a la creación de un diagnóstico presuntivo al igual que un tratamiento ideal para el tipo de lesión encontrada. El tratamiento por realizar será determinado por el daño pulpar y peri radicular, al igual que el objetivo a alcanzar. El tratamiento de los conductos radiculares consiste en un procedimiento mecánico-químico, creando y conformando la anatomía radicular para la adecuada limpieza y desinfección de ella para así promover la disminución, curación y cicatrización de los tejidos dañados. Este tratamiento está indicado para varias patológicas pulpares como es la pulpitis sintomática y asintomática, necrosis pulpar, periodontitis apical sintomática o asintomática, fracturas dentales con daño pulpar, etc. (Dahlkemper et al., 2013)

Un tratamiento endodóntico exitoso debe de reunir varias condiciones como son: la permanencia de la pieza dental en boca y en función, ausencia de lesiones periapicales en los estudios radiográficos, lograr la reparación y regeneración de los tejidos sin sintomatología, evitar la evolución de un proceso patológico, y estimular la formación de nuevas barreras biológicas dentro de la capacidad de cada diente y paciente. El pronóstico de cada tratamiento va a depender de las condiciones del diente a tratar al igual que las condiciones sistémicas y locales del paciente. (Hargreaves KM, 2011)

## MARCO TEORICO

### Terapia Pulpar

Los principales factores o causas que inducen el daño y la enfermedad pulpar son de origen inflamatorio o infeccioso, los cuales son causados por caries, microorganismos, traumatismos, desgaste dental, etc. El diagnóstico se define como la "la capacidad de una prueba para discriminar entre la condición patológica y la salud. Este potencial discriminativo puede cuantificarse mediante las medidas de precisión diagnóstica como la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos ya determinados por estudios". Para el diagnóstico de una patología pulpar se puede decir que es de manera subjetiva (lo que le paciente percibe y siente) y de manera objetiva (evidencia clínica), y para entender e identificar la enfermedad hay que saber que como es una pulpa sana, el cual al realizar las pruebas de la anamnesis se basara en síntomas, los cuales el paciente nos tiene que referir como "normales", donde un diente a las pruebas sentirá y responderá lo "mismo" en todos los dientes en tiempos similares, las diferentes pruebas de vitalidad que se realizarán son: palpación, percusión y prueba térmica; al igual que la radiográfica. (Dahlkemper et al., 2013; Levin, Law, Holland, Abbott, & Roda, 2009) El dolor es una forma subjetiva de llegar a una respuesta objetiva clínica, ya que nos da una descripción de los síntomas, del como y cuando lo percibe el paciente, para así poder recrear el dolor e identificar los signos. La mayoría de las veces el dolor se relaciona con algun grado de daño pulpar, existen diferentes tecnicas para evaluar y medir el dolor, se han descrito varias escalas las cuales incluyen verbales, de colores, caras, numericas, analogas, cuestionarios, etc.pero ninguna de esta nos da un diagnóstico, solo es una técnica auxiliar para llegar a este. Como se ha mencionado antes las diferentes pruebas que se realizan en conjunto nos llegan a dar signos y síntomas característicos de cada patología, pero existen otras pruebas o técnicas como son la anestesia selectiva, el cual nos ayuda a bloquear el dolor de zonas y así poder identificar bien de donde proviene, presión cuspidea y pigmentación dental, el cual nos identifica si puede existir una posible fisura o fractura del diente,etc. (Idon, Sotunde, & Ogundare, 2020; Levin et al., 2009; Newton, Hoen, Goodis, Johnson, & McClanahan, 2009) El como reacciona el diente y la pulpa a estas técnicas diagnosticas es lo que nos va a dar un diagnostico mas preciso, pero existen otros factores a considerar y tomar en cuenta, como es la edad del paciente, sensibilidad del paciente al dolor, presión y dirección aplicada en las pruebas, tiempo en las pruebas diagnosticas, presencia de enfermedades sistemicas y el motivo de la consulta.(Newton et al., 2009)

La enfermedad pulpar se puede clasificar de forma general en casos vitales o no vitales, en los cuales los vitales todavía hay un aporte sanguíneo a la pulpa, el cual los signos y síntomas suelen ser más dolorosos por el hecho de que existe una reacción de los mediadores de la inflamación y crean presión intrapulpar, y al ser el diente una estructura dura, no hay donde liberar esa presión. Estos casos son retadores ya que el mayor desafío es tratar la patología causando el menor dolor posible; mientras que los casos no vitales nos enfrentamos con un desafío microbiológico, ya que existe un desbalance en la relación huésped-bacteria, en el cual las bacterias o microorganismos incrementan y el sistema inmunológico o de defensa del huésped está disminuido, estos casos pueden ser sintomáticos o asintomáticos, ya que puede haber una vía de escape del proceso infeccioso y disminuir la presión de gases y fluidos que se están creando. El objetivo al que se quiere llegar en estos casos es la disminución de la carga bacteriana para que el sistema inmune pueda actuar y ayude a sanar los tejidos periradiculares. (Hargreaves KM, 2011)

Una vez ya identificado el caso general, podemos irnos a los más específicos, que es cuando los signos y síntomas son repetidos y podemos nombrar las diferentes patologías pulpares. La pulpitis reversible implica la inflamación pulpar, esta puede ser causa de alguna agresión hacia ella, como es la caries dental, traumatismo, restauración mal adaptadas, etc. La sintomatología puede ir desde leve a severa, el cual involucra hipersensibilidad dental con actividades del día a día, como comer alimentos ácidos o dulces, bebidas frías o calientes, el cepillado dental, etc. Como su nombre lo dice es una inflamación pulpar reversible, ya que al momento de retirar la etiología que está causando la agresión a la pulpa, esta mejora. (Idon et al., 2020; Levin et al., 2009; Seltzer et al., 1963)

Pulpitis irreversible ocurre cuando existe un proceso degenerativo por la inflamación pulpar, y esta a pesar de retirar la agresión no sana, pierde su capacidad para reparar tejido pulpar. Si esta no es tratada a tiempo puede evolucionar a necrosis pulpar y causar un proceso infeccioso. Esta se puede clasificar en pulpitis irreversible asintomática y sintomática. La primera se caracteriza por la ausencia de dolor clínico; y la pulpitis irreversible sintomática se caracteriza por un dolor leve a severo, que puede producirse cuando el diente está expuesto a estímulos que llegan a agredir a la pulpa, como alimentos dulces, calientes o frías, etc; este dolor puede ser agudo o sordo, y el dolor se prolonga más allá de la eliminación del estímulo. El dolor puede describirse como breve e intenso, cuando el estímulo está activo, pero varía con la percepción de cada paciente, el dolor se resuelve después de que se elimina el estímulo, pero continúa una molestia; la capacidad de reparación del diente requiere retirar la etiología de la inflamación, al igual que la eliminación del tejido pulpar

inflamado. El tratamiento de la pulpitis irreversible es una terapia de los conductos radiculares o la extracción dental. (Idon et al., 2020)

Necrosis pulpar es la patología pulpar en el cual hay pérdida de la aportación de los vasos sanguíneos y por ende pérdida de la vitalidad dental, esta puede ser ocasionada por trauma, evolución de una pulpitis, invasión bacteriana, etc. Por la falta de irrigación sanguínea la capacidad regenerativa y protectora que tiene la pulpa se pierde y las células van muriendo, los síntomas que esto ocasiona pueden variar, desde no tener sintomatología a los estímulos o tener un dolor severo a la masticación, también puede reaccionar a estímulos como el calor pero en pocas ocasiones, otros signos también pueden revelarse como el cambio de coloración del diente, creación de un tracto sinuso, o dolor a la masticación. En estos casos se debe realizar un tratamiento de los conductos radiculares, para retirar todo el material necrótico o disminuir la invasión bacteriana, todo dependiendo de la etiología de la necrosis. (Ma et al., 2016)

El tratamiento endodóntico o de conductos puede ser no quirúrgico o quirúrgico con una tasa de éxito que va desde 70% hasta un 90%, como se ha mencionado antes, su pronóstico y tasa de éxito depende de las condiciones locales y sistémicas del paciente, al igual de como se llevo a cabo el tratamiento. (Chércoles-Ruiz, Sánchez-Torres, & Gay-Escoda, 2017)

### **Tratamiento Radicular No Quirúrgico**

El abordaje no quirúrgico (tratamiento del conducto radicular) implica el uso de una técnica biológica, química y mecánica para promover la reparación y curación de los tejidos perirradiculares mediante la limpieza y desinfección del sistema del conducto radicular. Este comienza con un acceso adecuado que puede ser dictado o no, por la anatomía del diente, tamaño de la cámara pulpar, caries dental, fractura, material de obturación, etc.; todos estos deben ser removidos para visualizar todas las estructuras internas. Un tratamiento eficaz se logra después de la limpieza, conformación de los conductos, desinfección y obturación de las estructuras internas del diente. Si la patología y sus síntomas del diente no desaparecen después del tratamiento, está indicado un retratamiento. El retratamiento consiste en retirar la obturación anterior del conducto radicular, para volver a realizar el procedimiento, aliviando los signos y síntomas de la patología, así como reparar los tejidos perirradiculares. (Dahlkemper et al., 2013; Ma et al., 2016; Su, Gao, Yu, Wang, & Yu, 2010)

La tasa de éxito del tratamiento del conducto radicular varía del 42 al 86% y para el retratamiento endodóntico es del 84 al 88% después de 4 a 10 años de seguimiento. Siempre y cuando sea posible el tratamiento no quirúrgico debe ser la primera opción para intentar mejorar el tratamiento de la condición dental. Después del retratamiento del conducto radicular, la patología puede persistir y desarrollar gradualmente una periodontitis periapical refractaria, donde permanecen los signos y síntomas, se ha informado una prevalencia de un 4-15% de los casos reportados. La solución a este problema es el tratamiento de endodoncia quirúrgica que involucra diferentes tratamientos: incisión y drenaje, trepanación, curetaje perirradicular, biopsias, resección radicular, reimplantación intencional y remoción de la porción apical de la raíz. (Chércoles-Ruiz et al., 2017; Dahlkemper et al., 2013; Kim & Kratchman, 2006; Kohli, Berenji, Setzer, Lee, & Karabucak, 2018; Ma et al., 2016)

El paso final del tratamiento radicular es el sellado tridimensional de los conductos con gutapercha, existen distintas formas de lograr el sellado de los conductos radiculares, una es con obturación ortograda y la segunda es con gutapercha termoplastificada, la primera está asociada con uso de técnicas simples en las que se puede o no implicar calor o solventes para lograr la adaptación de la gutapercha a las paredes de la raíz, en la técnica se coloca gutaperchas con cemento hasta que se llena el conducto radicular. Pero porque la anatomía del sistema del conducto radicular es compleja es difícil conseguir que el material llegue a todos los lugares deseados, por lo que se pueden dejar espacios sin material de obturación, ya sea cemento o gutapercha. La técnica de termoplastificado es una forma más fácil de lograr este objetivo, ya que la gutapercha se calienta hasta que sus propiedades físicas cambian y se puede inyectar al conducto radicular, estudios han demostrado que la gutapercha tiene una naturaleza porosa, y sus propiedades contienen una absorción de humedad que expande el material y luego se contrae cuando se solidifica, lo que si se consigue una buena adaptación pero aún puede llegar a tener filtraciones de bacterias o sustancias hacia el canal y los tejidos perirradiculares (Aliuddin et al., 2017; Sk & Br, 2003). Actualmente se siguen realizando estudios que intentan probar el mejor material para un sellado y adaptabilidad en el sistema radicular del conducto.



## **Tratamiento Radicular Quirúrgico**

El concepto de cirugía en endodoncia comienza en 1728 cuando John Hunter en su libro "Tratado De La Historia Natural De Los Dientes" habla de una teoría de llegar al final de la raíz para tratar patologías pero no estaba seguro de si eso era posible. Esta era una pregunta común entre los cirujanos de todo el mundo: ¿Cómo tratar enfermedades en lugares donde no se puede alcanzar? A finales de siglo el Dr. Farrar escribió sobre la amputación radicular, luego de que la cirugía apical también fuera descrita por Schamber en 1906, realizando una osteotomía y una escisión radicular medial en un primer molar, utilizando fresas quirúrgicas para lograrlo y las radiografías como un método de diagnóstico. (Aliuddin et al., 2017; Hargreaves KM, 2011; Winstock, 1980)

El objetivo del abordaje quirúrgico es mantener el diente el mayor tiempo posible en boca eliminando la etiología de la patología remanente en la porción apical, favoreciendo la reparación de tejidos duros y blandos. La cirugía apical tiene como objetivo tratar los dientes que no cicatrizan después de un tratamiento del conducto radicular o terapia de retratamiento y prevenir la reinvasión de bacterias y subproductos del sistema del conducto radicular en los tejidos perirradiculares para la preservación de los dientes; sellando el sistema del conducto radicular, creando una barrera de un nuevo material que permite la cicatrización de los tejidos perirradiculares y mejora la calidad del sellado apical. (Dahlkemper et al., 2013; Tsesis, Elbahary, Venezia, & Rosen, 2017; Von Arx, Hänni, & Jensen, 2010)

Las causas del fracaso del tratamiento no quirúrgico podrían deberse a la complejidad del sistema del conducto radicular, quistes verdaderos, reacción a cuerpo extraño, errores de procedimiento, condición sistémica del paciente, etc. La tasa de éxito esta técnica varía desde 59-93%, tales resultados pueden estar relacionados con las dificultades y complicaciones de los procedimientos, pero se informa que los casos clínicos ya cicatrizados a largo plazo después de 10 años, en un procedimiento quirúrgico la tasa de éxito es de alrededor del 81,5%. El procedimiento quirúrgico implica el acceso al sitio del problema (infección / accidente endodóntico) a través de una incisión, disección del colgajo y osteotomía (si es necesario) para tratar las condiciones locales (Allen, Newton, & Brown, 1989; Chércoles-Ruiz et al., 2017; Dahlkemper et al., 2013; Del Fabbro et al., 2016; Kim & Kratchman, 2006; von Arx, Jensen, Janner, Hänni, & Bornstein, 2019).

El potencial de reparación de cada individuo es el principal problema después de la cirugía endodóntica. Si el enfoque de planificación no es el indicado para el diente, es posible que no tenga una buena recuperación y que se necesite otra intervención. La indicación de un abordaje endodóntico quirúrgico se realizará solo si el diente presenta signos y síntomas clínicos como respuesta dolorosa y positiva a la percusión, a la palpación, masticación o presencia de un tracto sinusal después del tratamiento o terapia de retratamiento; también, evidencia radiográfica en la porción periapical, observándose una radiotransparencia que se agranda con el tiempo, engrosamiento apical del ligamento periapical, presencia de material sobreextendido en los tejidos periapicales, lesión persistente, etc. (Allen et al., 1989; Tesis et al., 2013) Pero el la principal razón del fracaso de los tratamientos endodónticos son las infecciones predominantes cuyas bacterias juegan un papel importante en el inicio, progresión y persistencia teniendo una alta tasa de patogenicidad, las cuales se asocian con una microbiota anaerobia mixta donde se pueden encontrar colonias bacterianas intra y extra radicales, hongos y virus. (Hargreaves KM, 2011)

El tratamiento quirúrgico consiste en la resección del extremo o porción de la raíz con persistencia patológica, conocida como apicectomía. El procedimiento tradicionalmente quirúrgico se realiza haciendo elevación de un colgajo mucoperiosteico de espesor total y osteotomía con fresas a baja velocidad con abundante irrigación salina, resección del extremo radicular retirando de 3-5 mm con un biselado en 45 °, una vez retirada la porción, se realiza una preparación retrógrada de 3 mm, la cual consiste en el retiro o eliminación de la porción de gutapercha expuesta con fresas/ ultrasonidos y rellenando el espacio con un nuevo material , que se puede ser de Láminas De Oro, Agregado De Trióxido Mineral (MTA), Ácido Etoxibenzoico (Super EBA), Material Restaurador Intermedio (IRM), Adhesivo Resina Compuesta (Retroplast), Amalgama, Biodentine Y Ionómero de Vidrio, entre otros. (Trope, Lost, Schmitz, & Friedman, 1996; Tesis et al., 2013; Von Arx et al., 2010)

Los materiales de obturación apical requieren de fisonomías físicas, químicas y biológicas, tales como biocompatibilidad, bioactividad, estabilidad dimensional, insolubilidad, fácil manejo, efectividad y capacidad de sellado, para que el procedimiento quirúrgico sea un éxito a largo plazo.(Sk & Br, 2003; von Arx et al., 2019)

La amalgama se ha informado desde 1884 como un material de obturación oclusal y apical, tiene varias ventajas como es su fácil acceso, económicas y buena manipulación, su tasa de éxito ha sido reportada de un 50 al 80% ya que era uso común, este éxito podría atribuirse a que tiene una

adaptación marginal buena y que va mejorando con el tiempo. (Sk & Br, 2003) Hoy en día los aspectos de sellado, biocompatibilidad y toxicidad son factores a tener en cuenta, por lo que en el caso de la amalgama esta tiende a desprender material, es sensible a la humedad, existe cierta corrosión del material y la contaminación por mercurio lo cual la descarta como un material potencial a largo plazo. (About, 2016) (Ma et al., 2016)

Las láminas de oro presentan alta biocompatibilidad y buena adaptación. Su primer informe sobre su uso en el tratamiento de conductos radiculares fue en 1913 por el Dr. Schuster y el Dr. Lyons en 1920; hoy en día, su uso es muy poco común debido a su costo y manipulación, ya que requiere la un entorno libre de humedad. (Aliuddin et al., 2017; Sk & Br, 2003) Son el estándar de oro de toda obturación.

El óxido de zinc y eugenol tuvo un auge en los materiales restauradores retrógrados, los cuales son el material restaurador intermedio (IRM) y el ácido súper etoxibenzoico (Super EBA), estos son económicos, fácil de manipular y se observaba buena respuesta in vivo, al ser superiores que la amalgama en terminos de sellado y biocompatibilidad, se llegaron a utilizar mucho. (Ma et al., 2016; Sk & Br, 2003; Mahmoud Torabinejad, Hong, McDonald, & Ford, 1995) Super EBA se introdujo en 1978 para ofrecer una nueva fórmula que no puede ser reabsorbible, fácil de manipular, no necesita cavidad de retención y consta de plasticidad que permite entrar en contacto con todas las paredes radiculares. La primera receta estaba hecha de un componente líquido-polvo cuyo polvo estaba compuesto por 60% de óxido de zinc, 34% de dióxido de silicón y 6% de resina natural: 62,5% de EBA y 37,5% de eugenol. (Oynick & Oynick, 1978) Después del boom del Super EBA, se introdujo una nueva fórmula para mejorarlo, agregando un 20% de polimetilmetacrilato al polvo, creando IRM. En algunos estudios comparativos de ambos materiales, se observó un 91% para el IRM y un 82% para el Super EBA de tasa de éxito después de 12 meses en cada grupo del estudio. (Saxena, Gupta, & Newaskar, 2013)

Cavit es otro relleno temporal a base de óxido de zinc que en un tiempo se utilizó en cirugía apical, por su fácil manipulación y característica suave se pensó que era buena idea, pero se ha demostrado una gran solubilidad en superficies húmedas, con grandes filtraciones permeables con el paso de tiempo y una baja biocompatibilidad con tejidos perirradiculares. En 1968 se introdujo el cemento de policarboxilato que consiste en una modificación del óxido de zinc y una solución líquida de ácido poliacrílico. La consistencia de la mezcla de ambos produce un material duro y de bajo pH (1,7) que

se puede manipular fácilmente; pero muestra una respuesta tisular cuestionable y con el tiempo muestra poca capacidad de sellado. (Sk & Br, 2003)

En 1969 Wilson y Kent crearon cementos de ionómero de vidrio, que es una mezcla de líquido y polvo que contienen ácido polialquenoico, que utiliza ácido acrílico homopolímero y polvo de vidrio de aluminosilicato, con óxido de aluminio, sílice y fluoruro de calcio. Esta combinación establecida por una reacción ácido-base, es muy hidrófila, con liberación prolongada de fluor, buen modo de elasticidad muy similar a la dentina. A pesar de todo lo bueno, tiene algunas desventajas como deshidratación, malas propiedades físicas y mecánicas, baja resistencia al desgaste y mala adaptación marginal. Es un material que está constantemente en modificaciones y podría ser prometedor. (Ching, Luddin, Kannan, Ab Rahman, & Abdul Ghani, 2018; Sk & Br, 2003)

El cemento de fosfato de calcio se conoce comúnmente como cemento de hidroxiapatita, con dos mezclas de un ácido y un compuesto básico, está compuesto de fosfato tetracálcico y fosfato dicálcico; estos compuestos se mezclan con agua formando una reacción isotérmica para formar una textura sólida. Finalmente, el cemento consiste en un material cristalino, con una excelente biocompatibilidad, alta resistencia compresiva, manteniendo su forma y volumen a largo plazo, características porosas y radiopacas (Sk & Br, 2003)

Las resinas compuestas son un material muy versátil por sus propiedades y biocompatibilidad por la naturaleza de sus componentes. Hay dos materiales compuestos específicos a base de resina utilizados en las obturaciones de las terminaciones radiculares, el Retroplast (Retroplast Trading, Rørvig, Dinamarca) y Geristore (Den-Mat, Santa Maria, CA, EE. UU.) (Saxena et al., 2013)

Ambas resinas BIS-GMA / TEDGMA, Retroplast tiene un agente adhesivo a la dentina, no se condensa y se aplica en la superficie cóncava de la resección, con la intención de sellar los túbulos dentinarios externos en contacto con los tejidos periradicales y dentro del canal. Los estudios a largo plazo con Retroplast mostraron una tasa de éxito del 78%, lo que indica una curación radiográfica completa y sin sintomatología. El fracaso es según un parámetro clínico y radiográfico subjetivo donde se consideró como una patología periapical persistente; la reintervención, síntomas como dolor y drenaje de fístulas (Yazdi et al., 2007). Geristore es una resina compuesta de vidrio con liberación de flúor, con bario, fluorosilicato y matriz orgánica. Tiene una contracción de polimerización baja, hidrófila, no acuosa y altamente biocompatible que lo convierte en una excelente opción como material de relleno. (Al-Sabek, Shostad, & Kirkwood, 2005)

## **Biocerámicos**

Los materiales biocerámicos se definen como una mezcla de cerámicas compuestas por elementos metálicas y no metálicas, unidas por enlaces iónicos y covalentes, con propiedades biológicas inductivas utilizadas en medicina y odontología (Tawil, Duggan y Galicia, 2016) (Abusrewil, McLean y Scott, 2018). Algunos materiales biocerámicos son: hidroxiapatita carbonatada (HA)  $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ , fosfato cálcico amorfo (ACP), fosfato tetracálcico (TTCP)  $(Ca_4(PO_4)_2O)$ , fosfato monocálcico monohidrato (MCPM)  $(Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O)$ ,  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP)  $(\beta-Ca_3(PO_4)_2)$ ,  $\alpha$ -fosfato tricálcico ( $\alpha$ -TCP)  $(\alpha-Ca_3(PO_4)_2)$ , octa fosfato cálcico (OCP)  $(Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O)$  y vidrio bioactivo. (Khan & Syed, 2019)

De acuerdo a su interacción con los tejidos se clasifican de manera

- Bioinertes: No interactúan con los sistemas biológicos, no generan reacción en los tejidos (alúmina y zirconio)
- Bioactivos: Son aquellos que no se degradan, pero interactúan con el tejido circundante, induciendo una respuesta en los tejidos con los que está en contacto. (vidrio, fosfato de calcio, hidroxiapatita)
- Biodegradables: Son solubles o reabsorbibles, el cuerpo solo interactúa y absorbe las propiedades benéficas durante ese periodo de tiempo. (Espinoza & Lizana, 2020)

## **Mineral Trióxido Agregado**

La principal corriente biocerámica empleada en endodoncia es el Agregado de Trióxido Mineral (MTA) un polvo fino que consiste en silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, tetracalcio, aluminoferrita y óxido de bismuto, fue introducido en 1993 por Mohamed Torabinejad, pero hasta 1998 fue aprobado por la Asociación Federal Estadounidense (FDA). (Peter Zahi Tawil et al., 2009)(Abusrewil, McLean, & Scott, 2018; Islam, Kheng Chng, & Jin Yap, 2006; Peter Z Tawil, Duggan, & Galicia, 2016)(M. Torabinejad, Watson, & Pitt Ford, 1993). Es un compuesto parental del cemento Portland (PC); desarrollado por un proceso de purificación, resultando en la combinación de (Ca) calcio y selenio; sin presencia de aluminio, arsénico y algunos metales pesados de PC. Este material muestra una alta biocompatibilidad y se propuso para sellar las comunicaciones entre el sistema de conductos radiculares y los tejidos externos peri-radicales. (Abusrewil et al., 2018;

Parirokh & Torabinejad, 2010a; Peter Z Tawil et al., 2016; Mahmoud Torabinejad, Higa, McKendry, & Pitt Ford, 1994)

Como se ha mencionado antes MTA por sus propiedades químicas y físicas ha sido el material de elección para sellar comunicaciones y de obturación retrógrada durante muchos años. Las propiedades químicas contienen la composición de la patente MTA, que involucra óxido de calcio (CaO), silicio (SiO) y óxido de bismuto, algunas investigaciones también informaron sílice, contiene partículas hidrófilas que se fijan en presencia de humedad. Actualmente hay dos presentaciones de MTA: Gris y Blanco. Los componentes de MTA Gris son principalmente de silicato tricálcico (Ca<sub>3</sub>Si), aluminato tricálcico (Ca<sub>3</sub>Al) y óxido tricálcico (Ca<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) que se mezcla con agua destilada, las diferencias entre MTA Gris (MTAG) y MTA Blanco (MTAB) consisten en la ausencia de hierro y menores cantidades de aluminio y magnesio. MTAW fue creado para dar una propiedad más estética, ya que en el gris existe cierta oxidación al entrar con la humedad y puede llegar a pigmentar. (Kim & Kratchman, 2006)

La Organización Internacional de Normalización (ISO) para materiales de sellado de conductos radiculares dentales ISO 6876: 2012, tiene requisitos específicos para métodos determinados como radiopacidad, resistencia, tiempos de fraguado, solubilidad, cambio dimensional, fuga bacteriana, etc., esto determinará si los materiales son de adecuado uso clínico. En el mercado existen varios tipos de MTA; MTA Angelus de Brasil, Egeo de Argentina, MTA Bio, MTA fotopolimerizable y selladores MTA como MTA-Obtura, etc; todas estas presentaciones deben tener los requisitos de la ISO, a pesar de sus diferentes composiciones y usos. (Islam et al., 2006; Parirokh & Torabinejad, 2010c)

Las principales diferencias entre Portland y MTA, es la presencia de óxido de bismuto (Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) y la falta de potasio en MTA que proporcionan la radiopacidad, se ha reportado una radiopacidad de 7.17 mm que es equivalente a un espesor de aluminio altamente aceptable para lo que ISO y ANSI / ADA, tienen un procedimiento estandarizado con una escala de aluminio para analizar la radiopacidad del material, 1 mm de dentina equivale a 1 mm de aluminio en cuña escalonada graduada; y de acuerdo con esto, ANSI / ADA tiene un requisito mínimo de 57 de su escala que corresponde a un Al de 3 mm. Según los requisitos de ISO, algunos estudios informan que MTAB y MTAG están en la norma, 6,74 mm Al para MTAB y 6,47 mm Al para MTAG. El cemento Portland no

tiene esta característica de radiopacidad con apenas 0.93 mm. (Borges et al., 2011; Guerreiro-Tanomaru et al., 2014)(Parirokh & Torabinejad, 2010a)

Se ha informado que el MTA tienen biomateriales activos con el potencial de ser compatibles con fluidos naturales, esto podría deberse al uso de solución salina tamponada con fosfato que es como un medio in vivo, pero a pesar de que tiene una buena interacción con los tejidos peri-radicales puede contaminarse con sangre y afecta la morfología y la liberación de iones de calcio, cambiando de color y radiopacidad con el tiempo (Duarte et al., 2018)(Guerreiro-Tanomaru et al., 2014; Parirokh & Torabinejad, 2010a).

Una propiedad física importante del MTA es que al hacer la mezcla de polvo y líquido se transforma, lo que da como resultado un gel que solidifica, convirtiéndolo en una estructura dura, pero la manipulación, mezcla y condensación del material puede influir en las características físicas y químicas específicas del MTA de cada casa comercial estas podrían depender del producto y sus indicaciones, pero principalmente puede verse afectado por la relación polvo/ líquido, método de mezclado, presión de condensación, humedad, tipo de MTA, medio de almacenamiento, el pH del medio ambiente, el tipo de vehículo, el tiempo entre mezcla y colocación y la temperatura (Parirokh & Torabinejad, 2010b)

Se ha informado que existen diferencias de propiedades químicas y físicas relacionadas con los diversos líquidos utilizados en la mezcla, los tiempos de fraguado y la solubilidad se ven directamente afectados por la humedad. debido a su largo tiempo de acción, varía de 37 a 93 minutos dependiendo de la temperatura ambiente, algunos de los informes dicen que mezclar su polvo con agua esterilizada en una proporción de 3: 1 tendría un tiempo de fraguado de 165 + - 5 minutos ( 20 min, tiempo más rápido informado, a 75 ° C) hasta que solidifica, en MTAB es mas largo el tiempo de fraguado debido a la falta o disminución de los niveles de azufre y aluminato tricálcico. (Duarte et al., 2018; Sharifi, Araghid, Ghanem, & Fatahi, 2015) se ha reportado distintas sustancias que ayudan superar tiempos de fraguados largos, como son los diferentes aceleradores; ácido cítrico, ácido láctico, lactato gluconato de calcio y cloruro de sodio, estos mejoran los tiempos de fraguado pero cambian la resistencia a la compresión. Las diferencias en los tiempos de fraguado entre MTAG y MTAB no son clínicamente significativos. (Islam et al., 2006)

Las relaciones poder-líquido lo afectan, con mayores cantidades de relación aumenta la porosidad y solubilidad. Se informa que el uso de más agua aumentaría la liberación de calcio y esto influyó en

las condiciones clínicas. Se ha observado que el tamaño de los cristales de MTAG es mayor que MTAB, esto se debe al oxígeno distribuido a través de las fases y la forma de óxido de sus elementos (Parirokh & Torabinejad, 2010a). La porosidad se mide y evalúa mediante microscopía, datos bidimensionales y de superficie. La porosidad ha sido altamente reportada en MTA a los 7 y 30 días mirando la superficie irregular, los espacios vacíos llenos, el tamaño y la distribución de los poros sobre la superficie, esto podría ocurrir porque la cantidad de agua agregada, el atrapamiento de burbujas de aire o los espacios no son hidratado durante la mezcla y el valor ambiental de pH ácido. (Parirokh & Torabinejad, 2010c; Torres, Guerreiro-Tanomaru, Bosso-Martelo, Chavez-Andrade, & Tanomaru Filho, 2018)

Todas las propiedades físicas están unidas entre sí, la resistencia a la compresión es la capacidad de resistir las fuerzas mecánicas de condensación y estrés masticatorio durante el uso del material de hasta que se fractura.(Subramanyam & Vasantharajan, 2017) La resistencia a la compresión de MTA después de 24 horas tiene una tasa menor que la amalgama, IRM y super EBA, pero después de 3 semanas no tienen diferencias significativas, esto sucede debido a la composición de MTA que alcanza su máxima resistencia a la compresión después de varios días. Un estudio de Islam et al mostró la diferencia de resistencia a la compresión a los 3 días y a los 28 días de diferentes materiales, en los que MTAG muestra mayor resistencia a la compresión que MTAW, PC y PCW, donde a los 3 días se observo que el MTAG tiene una resistencia a la compresión de  $50.43 \pm 1.30$  MPa, cuando los otros materiales alcanzan entre  $40-39 \pm 2.86$  a  $48.06$  MPa y a los 28 días MTAG de  $98.62$  MPa, otros materiales  $48.53$  a  $86.02$  MPa, mostrando así que esta aumenta con el tiempo (Islam et al. , 2006) En otro estudio en el que MTA se contaminó con sangre y saliva para ver qué sucedía, al tercer día de incubación los resultados con saliva disminuyen a  $114,70$  MPa, y por el contrario el con sangre aumenta a  $176,44$  MPa. Otros estudios informan más resistencia a la compresión para MTAW, pero las discrepancias de los estudios pueden variar en varios factores como el líquido que se mezcla, la condensación, el tiempo de mezcla, el almacenamiento de MTA, el valor de Ph y los materiales y métodos del estudio (Parirokh & Torabinejad, 2010c; Subramanyam & Vasantharajan, 2017)

El coeficiente de pH indica el grado de acidez o alcalinidad de la solución; Se informa que el valor de pH de MTA después de mezclarse es de 10.2, y esto aumenta a 12.5, 3 horas después. (Mahmoud Torabinejad et al., 1995) Un estudio evaluó el pH en PCW, MTAG, MTAW y PC a lo largo del tiempo hasta 70 minutos, donde se mostró que WP tiene la alcalinidad de pH a 13.2, luego PC y MTAW con



13 y finalmente MTAG con 12.8. (Islam et al., 2006) Como muchas de las diferentes características de MTA, su dureza estará influenciada por la relación polvo-líquido, pero se ha visto también que diferentes espesores cambia su nivel de dureza. Otra propiedad que distingue al MTA son sus propiedades antibacterianas y antifúngicas; En muchos estudios se ha demostrado el efecto sobre bacterias facultativas, anaerobios estrictos y especies de hongos, pero también mostró una acción limitada sobre ellos, por lo que es una propiedad controvertida. (Parirokh & Torabinejad, 2010a)

### **Biodentine**

Biodentine es uno de los materiales más nuevos del mercado introducido en 2010 por Gilles y Oliver como sustituto de la dentina. Tiene diferentes aplicaciones e indicaciones clínicas como en tratamientos de reparación de dentina (grandes lesiones cariosas, recubrimiento pulpar indirecto y directo), tratamientos radiculares (perforaciones del conducto radicular, resorciones, apexificaciones y obturación retrógrada del conducto radicular). Biodentine es un material a base de silicato tricálcico ( $\text{Ca}_3\text{SiO}_5$ ), en una presentación de polvo y soluciones líquidas, donde el polvo está compuesto principalmente por silicatos tricálcicos, silicatos dicálcicos, carbonato cálcico y óxido como relleno, también contiene Circonio como radio-opacificante para una mejor ubicación en las radiografías. (About, 2016; Hiremath, Kulkarni, & Naik, 2015; Rajasekharan, Martens, Cauwels, & Verbeeck, 2014) El líquido es una mezcla de cloruro de calcio, un polímero hidrosoluble y agua que actúa como agente reductor. La mezcla de los materiales se debe hacer con un amalgador, creando una mezcla hidratada, precipitando los silicatos de calcio y creando un hidrogel, que con el tiempo continúa precipitando sobre los silicatos y disminuye la porosidad y aumenta la resistencia a la compresión. La biocompatibilidad con los tejidos orales está bien investigada para garantizar su uso seguro, se ha estudiado en células de pulpa humana, pulpa directa y pulpa indirecta, en cada una de las condiciones no se encontró que afectara la variabilidad de las células, también se ha estudiado en odontoblastos para ver su reacción, y lo que se ha encontrado es inducir la capacidad de mineralización, y la ausencia de toxicidad en ellos. (About, 2016)

Las propiedades físicas y mecánicas son estables y van mejorando con el tiempo, la resistencia a la compresión después de 35 minutos es de  $10,6 \pm 2$  MPa y  $57,1 \pm 12$  y  $72,6 \pm 8$  MPa después de 24 horas y 28 días respectivamente; su resistencia a la flexión es de 34 MPa, módulo elástico de 22.000 MPa, su porosidad es de 7,09 y aumenta con el tiempo, debido a la precipitación en los espacios vacíos sobre la mezcla de silicatos. Su Ph es alcalino y cambia con el tiempo, dos estudios diferentes

mostraron valores, el primer día mostró valores de 8.88 y 11.7 y a lo largo de una semana los resultados fueron 8.02 y 12.1. (de Vasconcelos et al., 2009; Grech, Mallia, & Camilleri, 2013; Rajasekharan et al., 2014) Debido a las diversas aplicaciones que tiene Biodentine, se estudia la fuerza de unión por empuje, que es la capacidad del material para permanecer en su lugar cuando se aplica una fuerza dentro del contacto de varios fluidos o superficies. El estudio evalúa la inmersión a la que se mezcla antes de colocar los materiales que fueron hipoclorito de sodio al 35%, clorhexidina al 2% o solución salina por 30 min, y los resultados fueron un promedio de 7,15 + -8,5 MPa. Otra solución que se ha estudiado sobre la resistencia al empuje es la contaminación sanguínea, en la que se demostró que no tuvo un efecto significativo sobre el material.(Guneser, Akbulut, & Eldeniz, 2013; Rajasekharan et al., 2014) (Guneser, Akbulut y Eldeniz, 2013; Rajasekharan et al., 2014)

Biodentine ha demostrado ser biocompatible con los tejidos bucales; El potencial citotóxico se ha estudiado con el método Conditioned Biodentine Medium (CBM) siguiendo las recomendaciones de la norma ISO 10993-12 mediante el uso de bromuro colorimétrico de 3- [4,5-dimetil-2-tiazolil] -2,5-difenil tetrazolio (MTT). ) ensayo, en el que se mide el cultivo proliferante y su viabilidad. En este estudio las condiciones se evalúan en porcentajes, por la actividad metabólica relativa, se calculó de la siguiente manera: actividad metabólica (%) = (DO de cultivos con CBM / DO de cultivos con medio fresco de control) x 100, por lo que los resultados se muestran sin diluir (100%) y 75% CBM fueron severamente citotóxicos, 50% CBM indujo citotoxicidad moderada, mientras que 25% CBM y concentraciones más bajas fueron no citotóxicas, además de estos parámetros los resultados pueden ser diferentes en un estudio a otro, debido a la línea que se utiliza. Pero debido a todos esos datos diferentes, se informa que no es citotóxico en concentraciones más bajas y puede tener propiedades antiinflamatorias, inmunorreguladoras y osteoprotectoras (Eraković et al., 2020; Kaur, Singh, Dhillon, Batra, & Saini, 2017)

También se han documentado propiedades antifúngicas y antimicrobianas, se debe a que la alta alcalinidad del pH, como se dijo antes, mejoró con el tiempo llegando hasta 12,8 dificultando el crecimiento del microorganismo. Ha sido probado por diferentes estudios. Ambos estudios demostraron que Biodentine tiene mayores propiedades antimicóticas y antimicrobianas contra *E. Faecalis* y *Candida albicans* (Bhavana et al., 2015; Hiremath et al., 2015; Kaur et al., 2017).

## **Microbiología**

La microbiología es la ciencia que estudia, analiza y evalúa diferentes tipos de organismos que son difíciles de observar para el ojo humano, como: bacterias, hongos, parásitos, entre otros agentes, como virus, viroides y priones. Los microorganismos como bacterias y especies de hongos tienen una estrecha relación con la patosis radicular y periapical, que puede o no estar asociada a enfermedades pulpares, provocando una inflamación crónica y necrosis tisular.

## **Biofilm/ Biopelícula Bacteriana**

La biopelícula o biofilm se puede definir como "una comunidad tridimensional polimicrobiana de numerosas especies microbianas, incrustadas en una matriz que consta de productos metabólicos microbianos y / o componente huésped, adheridos a una superficie o sustrato" o también se puede decir que es cuando diferentes especies de bacterias y hongos interactúan creando una comunidad con productos metabólicos, proteínas y carbohidratos, que con el paso del tiempo otras especies comienzan a adherirse, creando un microbioma más complejo, más fuerte y por ende más patógeno, lo que hace que las especies vayan de aerobios a anaerobios, presentando una capacidad de resistencia, creando cuadros de crecimiento lento pero con difícil erradicación de este. (Levin et al., 2009; Willems, Xu, & Peters, 2016)

Esta interacción de microbios debe tener un anfitrión en el que puedan suplir sus necesidades. En la cavidad bucal puede estar en diferentes lugares como lengua, dientes, encía, etc. En dientes, estudios han reportado la invasión de áreas intrarradiculares y extrarradiculares. Debido a que los microorganismos pueden llegar a zonas de difícil acceso, esta patosis puede permanecer y persistir después de varios tratamientos para erradicarla. Wang et al, en un estudio demostraron que se pueden encontrar 26 especies diferentes en el biofilm extra-radicular, y concluyeron que "una comunidad multibacteriana, parece participar en el mantenimiento de la patología periapical persistente"(Wang, Jiang, Chen, Zhu, & Liang, 2012)(Zhang, Wang, Zhang, & Soo, 2010)

El hablar de infecciones persistentes en endodoncia es más de lo más común, ya que hoy en día muchos microorganismos han creado resistencia a medicamentos y a materiales que ayudan a su eliminación, estos casos de reinfecciones e infecciones persistentes son muchas de las veces a causa del biofilm o biopelícula microbiana. La lesión periapical puede contar con microorganismos en todo el sistema de conductos radiculares, como son conductos laterales y accesorios, ramificaciones,

conductos dentinarios e incluso en el exterior, cemento, tejidos perirradiculares y paredes externas radiculares en un 83% de los casos. El microorganismo forma un biofilm con características que difieren de la forma planctónica, esto ocurre porque la microbiota se adhiere a las superficies y sus productos y subproductos hacen que el ambiente sea ideal para la multiplicación y progresión del microorganismo, además de estas características también tienen capacidad de unión a otros microorganismos, la cual crean una convivencia y coagregación entre ellos. (Leonardo, Rossi, Silva, Ito, & Bonifácio, 2002; Wang et al., 2012)

Como se mencionó anteriormente, la formación de biofilm debe tener características y comportamientos que crean la capacidad de sobrevivir, la formación de biopelículas puede verse como un proceso de desarrollo gobernado por una respuesta adaptativa de las bacterias. La formación de biofilm va de una forma planctónica a una colonia que requiere de las creaciones de matriz extracelular y adhesinas para crear el biofilm, la creación o formación involucra diferentes etapas como i) Adherencia de microorganismos a superficies o entre sí, ii) Formación de microcolonias, iii) Maduración y iv) Crecimiento y dispersión. La respuesta inicial del biofilm es al medio ambiente, que puede ser aumento de c-di-GMP que es un mensajero intracelular que activa la creación de componentes de matriz extracelular y adhesinas o regulando los ARN disminuyendo la actividad proteica. Su arquitectura y organización se encuentra en microcolonias que es la unidad básica del biofilm, pero depende de las especies y las condiciones nutricionales del medio. La formación de este es una respuesta adaptativa de bacterias individuales, pero a nivel de grupo también podemos ver actividad metabólica y esto aumenta la supervivencia y los rasgos adaptativos de la bacteria. (Ch'ng, Chong, Lam, Wong, & Kline, 2019; Tolker-nielsen, 2015)

La periodontitis apical es una enfermedad inflamatoria causada por una infección bacteriana, muchas veces esta es persistente después del tratamiento de conductos, pudiendo ser causada por biofilm compuesto de bacterias resistentes a los medicamentos, infección extra radicular, por la entrada de bacterias durante el tratamiento, etc. (Al-Hezaimi, Naghshbandi, Oglesby, Simon, & Rotstein, 2006; Provenzano et al., 2016) Para ver de qué está hecho este biofilm, se han realizado varios estudios que muestran diferentes patrones de microorganismos. *Signoretti y col.* En sus resultados reportaron especies como *Actinomycesnaeslundii* y *Actinomyces meyeri*, *Propionibacterium propionicum*, *Clostridium botulinum*, *Parvimonas micra* y *Bacteroides ureolyticus*. (Signoretti et al., 2011) *Jia-De et al.* muestran que las bacterias más prevalentes fueron *Peptostreptococcus micros* y *Fusocatubacterium fecalis* y *veillonella parvula*. En otro estudio

dominó *P. endodontalis* 45%, *Actinomyces viscosus* 42%, *Candida albicans* 36% y *Porphyromonas gingivalis* 27%, seguido de *Enterococcus faecalis* con un 15% de las muestras. (Zhang et al., 2010) En los distintos estudios se ha visto que los resultados de qué tipo de microorganismos pueden estar presentes en casos con infección persistente pueden variar debido a los métodos utilizados en cada investigación.

Los estudios basados en cultivos muestran que la flora microbiana se limita a grampositivos facultativos como *Enterococcus*, *Actinomyces* y *Propionibacterium*. Al momento de aislar los microorganismos de una muestra una infección persistente el *Enterococcus faecalis* es una de las especies más frecuente detectadas junto con *Actinomyces*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*.(Signoretto et al., 2011)

Los enterococos son cocos gram positivos, facultativos, anaerobios que pueden ser simples, pares o cadenas cortas, con capacidad de crecer a 10 ° C y 45 ° C, con un pH de 9,6, en caldo de NaCl al 6,5%, y sobrevivir a 60 ° C, y viven en presencia o ausencia de oxígeno (Kayaoglu & Ørstavik, 2004; Souto & Colombo, 2008) Las especies de enterococos se dividen en cinco grupos dependiendo de su interacción con manitol, sorbosa y arginina. *Enterococcus faecalis* es una especie de bacteria facultativa grampositiva, del mismo grupo que *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii* y *E. gallinarum*, que forman ácido en el manitol e hidrolizan la arginina. (Stuart, Schwartz, Beeson, & Owatz, 2006) Es una de las bacterias más patógenas que se han encontrado en casos de periodontitis crónica y se considera la principal causa del fracaso del tratamiento del conducto radicular.(Chen et al., 2018) *E. faecalis* es un anaerobio facultativo, que puede crecer en presencia o no de oxígeno, puede encontrarse en pares, cadenas simples o cortas. La mayoría se encuentran en la cavidad bucal y los tractos genitales. Sobrevive en ambientes escabrosos, con pH altamente alcalinos, puede crecer a una temperatura de 10 °-45 ° C y sobrevivir a 60 ° C durante 30 minutos; estas características hacen que *E. Faecalis* sea capaz de sobrevivir y trasladarse del conducto radicular a otras áreas y desempeñar un papel muy importante en las infecciones oportunistas, pero en la cavidad bucal es un microorganismo habitual y normal. Su prevalencia en boca aumenta con el tratamiento de conductos, como dije antes se relaciona con lesiones perirradiculares crónicas asintomáticas, su prevalencia en infección primaria es del 40% y en secundaria aumento hasta 77% y se encuentran en un 23-70 % de los cultivos aislados. (Kayaoglu & Ørstavik, 2004).

*E. faecalis* se ha visto en unidades formadora de colonias (ufc) de hasta 10<sup>5</sup>-10<sup>8</sup> ufc, sobrevive en ambientes muy hostiles, debido a una matriz polimérica extracelular, sensor de quórum, sistema de transducción y regulador transcripcionales de unión al azúcar que hacen resistentes a las bacterias. En su estado planctónico es aproximadamente de 100 a 1000 veces más resistente. Los medicamentos intraconductos, como el hidróxido de calcio, son muy efectivos para reducir y erradicar las bacterias en la periodontitis apical, debido a que la liberación de iones hidroxilo (OH<sup>-</sup>) produce un pH de 13,5, altamente alcalino que tiene la capacidad de dañar el ADN de las bacterias, pero *E. faecalis* es alcalino resistente y no se puede erradicar fácilmente, esta es una de las razones por las que siempre está en los casos de reinfección.

*Enterococcus faecalis* tiene una prevalencia del 24% al 77% en infecciones persistentes asintomáticas. Lo que hace que la virulencia de *E. faecalis* sea factores de su adherencia a las células huésped, expresando proteínas que le permiten competir con otros microbios y alterar la respuesta del huésped, suprimiendo la acción de los linfocitos, haciendo que el tratamiento falle. Pero lo que realmente hace que la enfermedad sea tan fuerte y persistente es la capacidad de supervivencia, ya que tienen un mecanismo de defensa adaptativo y de supervivencia, que los hace vivir en condiciones desfavorables, este método se denomina viable no cultivable; en el cual las bacterias están vivas o latentes pero no pueden crear colonias y formar biopelículas en condiciones que usualmente pueden, en este estado el microorganismo cambia morfológica y metabólicamente modifica su potencial de virulencia y expresión génica, en este estado puede permanecer por muchos años, hasta que bajo ciertas circunstancias puede reactivarse o volver a su forma inicial abandonando el estado no cultivable. Algunos autores piensan que esta es la razón principal por la que *E. faecalis* es una bacteria tan resistente y siempre se encuentra en ambientes hostiles. (Chen et al., 2018; Dahlén, Samuelsson, Molander, & Reit, 2000; Kayaoglu & Ørstavik, 2004; Stuart et al., 2006; Tamagnini & Paraje, 2015)

Se han realizado varios protocolos para la erradicación de *E. faecalis* el cual se requiere la entrada en los conductos y tubulos dentinarios, uno de ellos es hacer una mayor conformación de los conductos para que sea más fácil que el medicamento ingrese, penetre y facilite la extracción, disminución y erradicación del microorganismo. El hipoclorito de sodio, el agua ozonizada, el fluoruro estanoico, el EDTA y la clorhexidina son eficaces para reducir o eliminar *E. faecalis* del conducto radicular individualmente o en combinación. Un protocolo que ha mostrado buenos resultados en dos días de cita es una adecuada instrumentación donde se aumenta el tamaño de la

preparación apical para dejar pasar los irrigantes, que van a ser 10 ml de hipoclorito de sodio al 6%, EDTA a 17 % y Clorhexidina al 2% entre cada irrigante que hay que irrigar con suero fisiológico; los medicamentos intracanal van a ser una mezcla de gel de clorhexidina al 2% e hidróxido de calcio, se puede calentar para tener una mejor acción sobre el microorganismo, pero además de todos estos irrigantes y medicamentos efectivos, este aún puede sobrevivir (Stuart et al., 2006)

### **Cultivo Bacteriano**

El estudio del comportamiento de estos microorganismos se realiza en laboratorios, permitiendo que el microorganismo crezca y cree biofilm, es necesario brindarles un ambiente con medio de cultivo con nutrientes y condiciones fisicoquímicas adecuadas para su desarrollo. Los componentes de los medios de cultivo son una fuente de nitrógeno que puede hidrolizar proteínas o peptonas, carbono (CO<sub>2</sub>), Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, vitaminas y un tampón de pH. Los medios de cultivo vienen en diferentes presentaciones y cada uno tiene sus indicaciones en función al microorganismo que se vaya a estudiar.

- Líquidos (caldos): no contiene ningún agente gelificante, el crecimiento es más rápido ya que esa movilidad permite un acceso más fácil a los nutrientes.
- Semisólidos: Son aquellos que contienen una proporción de agar inferior al 0,5%.
- Sólidos: Tienen un contenido en agar de aproximadamente el 1,5%. El crecimiento se desarrolla en la superficie del medio y se deposita en placas de Petri o en tubos de ensayo.

Algunos microorganismos aeróbicos estrictos pueden crecer en la superficie de las placas de agar y en la parte superior de los medios líquidos, pero si se desea obtener organismos aeróbicos en grandes cantidades, se debe disminuir la exposición del medio a la atmósfera. La ventilación aumenta por la agitación constante del medio líquido inoculado e introduciendo aire estéril en el medio. Para las bacterias anaerobias estrictas que se inhiben por contacto con el oxígeno (O<sub>2</sub>), debemos cambiar su potencial reductor (Eh) para que puedan comenzar a crecer, la mayoría de las bacterias anaeróbicas se inhiben a valores de Eh superiores a -100 mV, y algunas no inician su crecimiento. Para su potencial crecimiento se necesitan valores superiores a -330 mV. Para reducir el medio se utiliza cistina, tioglicolato o Na<sub>2</sub>S, para lograrlo en los cultivos líquidos se utilizan tubos,

matraces, o cámaras anaerobias (Brewer, Torbal, Gas Pack, etc.) todos estos tienen el mismo principio. Los microorganismos necesitan muchas cosas para poder vivir, su crecimiento puede verse influenciado por diferentes factores como temperatura, pH, concentraciones de oxígeno, nutrientes, etc. Por eso, es importante conocer las necesidades del microorganismo con el que estamos trabajando.

Cuando las bacterias se cultivan en un ambiente cuya composición permanece constante se les agregan continuamente nutrientes y se eliminan los productos de desecho, exponencializando el crecimiento se llama cultivo continuo. Estos se puede lograr con quimiostatos y cultivos turbidostáticos. El primero, se retiran alícuotas de cultivo y se reemplazan con un medio de cultivo fresco que contiene nutrientes y el turbidostático tiene una fotocélula que regula el caudal del medio para mantener una turbidez predeterminada. Estos cultivos son ideales para simular condiciones naturales en estudios. (Cerra et al., 2013; Pérez, 2016)

Otra forma en la que se puede realizar el cultivo es mediante la dinámica de los fluidos, que se basa en los movimientos del entorno bacteriano, estos movimientos ayudan a recrear el entorno en el que las bacterias están acostumbradas y pueden crecer. Los fluidos dinámicos tienen dos tipos diferentes de flujos, pueden ser laminares o turbulentos, lo que marca la diferencia es el esfuerzo y la velocidad a la que se somete el fluido. El movimiento de flujo laminar es estable, agudo y a baja velocidad. Para el flujo turbulento, el movimiento es caótico, no coordinado y rápido. El número de Reynolds (NR) es la medida que clasifica el flujo, está relacionado con la densidad, viscosidad, velocidad y dimensión típica de un flujo en una expresión adimensional; Diversos estudios han demostrado que el número de Reynolds que es menor o igual a 2000, es de régimen laminar, mientras que por encima de 3000 el régimen es turbulento, pero esto puede variar dependiendo de los criterios de cada ambiente. El método más utilizado para recrear el flujo laminar es con cabinas/campanas de flujo de aire, que pueden tener muchos usos, como para reducir los recuentos microbianos en el aire en laboratorios de investigación médica, en anfiteatros quirúrgicos, unidades de cuidados intensivos y colonias de animales. Una campana de flujo laminar funciona pasando aire de atrás hacia adelante a través de un filtro EPA que elimina las partículas de talato de dioctilo con un diámetro de 0,3 m. el aire sale del filtro a una velocidad promedio de 100 pies (30,48 m) / min y viaja horizontalmente a través de la campana con una turbulencia mínima o movimiento de aire "laminar". (Coriell & McGarrity, 1970)



El crecimiento bacteriano se puede identificar mediante una serie de pruebas microbiológicas: morfología colonial, morfología celular, prueba de bilis-esculina positiva, tolerancia al oxígeno y crecimiento en caldo BHI NaCl al 6,5%.

- **Morfología colonial** en placas de agar Müeller Hinton. Se recolectaron muestras de caldo BHI recuperadas de los aparatos de prueba, puntos de papel cultivados e inóculo bacteriano, se sembraron en placas de agar Müeller Hinton (Merck, Darmstadt, Alemania) y se incubaron a 37°C durante 24 horas para verificar la aparición de crecimiento de *E. faecalis* mediante análisis de morfología colonial.
- **Morfología celular.** Después del cultivo en placa de agar, se prepararon frotis en portaobjetos de vidrio y se tiñeron con el método de Gram para identificar la morfología microbiana.
- **Tinción de Gram:** que consiste en la pigmentación de bacterias reconociendo las bacterias Gram positivas y Gram negativas (GN), según la estructura de la pared bacteriana, las primeras retienen la tinción azul-violeta, y las GN se decoloran y luego se tiñen con safranina que es una mancha rojosa. (de Paz, 2007)

Para medir la formación del biofilm existen diferentes y varios métodos cualitativos y cuantitativos, algunos se basan en técnicas que solo pueden monitorear el aumento o disminución del mismo, mientras que otros brindan otra información como las propiedades químicas. Algunos métodos son: microbalanza de cristal de cuarzo, fotometría de gran área, capacitancia eléctrica, dispositivos de fibra óptica, turbidimetría, dispersión de luz, transferencia de calor, caída de presión, señales de radiación, espectroscopia fotoacústica, ensayo de bioluminiscencia, sondas redox, fluorometría, etc. Algunos de estos métodos requieren la remoción del biofilm y ser sometidos a otro cultivo para medirlo. (Maurício, Dias, Jubilado, & Santana, 2013)

### **Microscópio Electrónico de Barrido**

Para evaluar y observar los detalles más pequeños de las cosas debemos ampliar la imagen. El microscopio electrónico de barrido (MEB) puede visualizar estructuras con alta resolución, lo que nos permite alcanzar un aumento de 10x hasta 130.000x, y tener una capacidad distinta para examinar la topografía dimensional, su composición elemental y la distribución de las características de la muestra. Para crear la imagen de la topografía no se logra mediante el enfoque óptico sino mediante secuenciación temporal, esto significa que se necesita una dispersión de electrones, en la

cual la bomba de electrones genera una imagen en blanco y negro a partir del rebote de electrones que se enciende y apaga, requiriendo un vacío para que los electrones puedan enfocarse y dirigirse a la muestra para producir la imagen, el vacío evita que los electrones entren en contacto con partículas y moléculas que pueden interferir con la calidad de la imagen. El bombardeo de electrones después del rebote de la muestra tiene otros dos detectores de imagen cargados positivamente diferentes y lo traduce en una espectrometría de rayos X característica y dispersa de rayos X que el MEB puede leer para mapear la composición de los elementos de la muestra. (Fischer, Hansen, Nair, Hoyt, & Dorward, 2012; Hayes & Pease, 1968; Nguyen & Harbison, 2017)

El MEB puede visualizar distintos tipos de muestras las conductoras y desecadas, no conductoras, desecadas o húmedas (orgánicas, biológicas, cristales y polímeros). Las segundas se debe de retirar el exceso de agua, se procesan deshidratando con alcohol o acetona, posteriormente se secan por el método de punto crítico (CPD, Critical Point Drying). El CPD es un método de secado que permite preservar la forma y estructura celular de la muestra. Se basa en la sustitución de líquidos (utilizados en la fijación y deshidratación: procesos iniciales de conservación) por CO<sub>2</sub>, que se evapora en determinadas condiciones de temperatura y presión sin dañar los tejidos de la muestra, ambas muestras deben estar recubiertas con una capa conductora para protegerlas y tener mejor calidad en la imagen, esta capa es una capa de oro o plata, o algún metal dependiendo el equipo. (Mozini, Vansan, Neto, & Pietro, 2009)

## **JUSTIFICACIÓN**

Hoy en día, la tasa de éxito de la terapia endodóntica es de hasta el 98% y la terapia de retratamiento es de hasta el 80%. El éxito de la cirugía de endodoncia dependerá de la selección del caso, el huésped, la disminución de bacterias, la eliminación de todo el tejido necrótico, el complejo de la anatomía, el material de obturación radicular, el sellado y las técnicas del operador. Se ha informado que los materiales biocerámicos MTA Gris, MTA Blanco y Biodentine tienen propiedades antimicrobianas, pero hasta ahora no hay informes sobre la formación de biofilm sobre las superficies después de la retroobtención apical. Por eso es importante evaluar la formación de biofilm sobre superficies de los materiales de obturación apical de manera in vitro. (Agrafioti, Tzimpoulas, Chatzitheodoridis, & Kontakiotis, 2016; Kim & Kratchman, 2006; Pannkuk, 2011)(Pannkuk, 2011)

### **Pregunta de Investigación**

¿Podría formarse biofilm bacteriano en la superficie de los materiales biocerámicos de retroobtención?

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

- Evaluar la presencia de formación de biopelícula de *E. faecalis* sobre la superficie de MTA Gris, MTA Blanco y Biodentine In Vitro

### **Objetivos específicos.**

- Simular la preparación apical y la retroobtención (Biodentine, MTAW y MTAG) en el disco de dentina de los dientes extraídos.
- Cultivar *E. faecalis* para crear biofilm en las superficies de MTA Gris, MTA Blanco y Biodentine.
- Observar y evaluar mediante Microscopio Electronico de Barrido la presencia de Biofilm de *E. faecalis* bacteriano.

## **HIPÓTESIS**

**Hi:** Se observará la formación biofilm de *E. faecalis* sobre las superficies del MTA Gris, MTA Blanco y Biodentine utilizado como material de obturación en cirugías apicales.

**Ho:** El biofilm de *E. faecalis* no se observará la formación sobre las superficies del MTA Gris, MTA Blanco y Biodentine utilizado como material de obturación en cirugías apicales.

## **METODOLOGÍA.**

### **Lugar de estudio**

- Laboratorio de Microbiología de la "Maestría de Endodoncia" de la "Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí" U.A.S.L.P, Mex.
- Instalaciones de la "Maestría en Ciencias Odontológicas" de la "Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí", U.A.S.L.P Mex
- Laboratorio de SEM del Doctorado en Ciencias Odontológicas de la "Universidad Autónoma de San Luis Potosí". U.A.S.L.P,Mex.

### **Diseño del estudio**

- Estudio observacional In Vitro (Manterola, Quiroz, Salazar, & García, 2019)

### **Criterios de selección de la muestra**

#### **Criterios de inclusión de la muestra**

- Premolares uniradiculares libres de caries extraídos por motivos de ortodoncia.

#### **Criterios de exclusión de muestra**

- Premolares con fisuras radiculares.
- Premolares con fracturas radiculares.
- Premolares con anatomía irregular.
- Premolares con raíz con un ángulo  $> 35^\circ$ .

#### **Criterios de eliminación de muestra**

- Muestras donde no se puede realizar la retro preparación apical.
- Muestras en las que no se puede realizar la retroobtención.
- Raíces de premolares fracturadas en el proceso de corte del disco de dentina.
- Discos de dentina fracturados

**Variables**

<b>VARIABLE</b>	<b>DEFINICIÓN CONCEPTUAL</b>	<b>DEFINICIÓN OPERACIONAL</b>	<b>ESCALA DE MEDICIÓN</b>
<b>INDEPENDENTE</b>			
<b>MTAG</b>	Material biocerámico utilizado en el procedimiento quirúrgico como sellador de retroobtusión.	Mezcla del material siguiendo las instrucciones comerciales de la casa.	Variable nominal cualitativa
<b>MTAW</b>	Material biocerámico utilizado en el procedimiento quirúrgico como sellador de retroobtusión	Mezcla del material siguiendo las instrucciones comerciales de la casa.	Variable nominal cualitativa
<b>Biodentine</b>	Material biocerámico utilizado en el procedimiento quirúrgico como sellador de retroobtusión.	Mezcla del material siguiendo las instrucciones comerciales de la casa.	Variable nominal cualitativa
<b>DEPENDIENTE</b>			
<b>Biofilm</b>	Estructura de una o varias especies bacterianas capaces de crear adherencia a superficies mediante la formación de polisacáridos extracelulares.	Evaluación observacional por SEM	Variable nominal cualitativa

## **Consideraciones Éticas**

-El proyecto de investigación sigue los requisitos de la Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-087-ECOL-SSA1-2000, la cual menciona las especificaciones de manejo de los Residuos Biológicos-Infecciosos para la protección ambiental, en la cual todos nuestros productos encajan en esta categoría. .

- Consentimiento de la clínica "RIO Clínica Dental Integral, Saltillo, Coah. MEX ". Donde se aclara la autorización del paciente para utilizar el diente extraído para investigación médica.

- La investigación fue evaluado y aprobado por el comité de ética de la "Universidad Autónoma de San Luis Potosí", que autorizó el uso de materiales y procedimientos para esta investigación In Vitro.

Numero de asignación: CEI-FE-035-020



## Fase Experimental

La fase experimental se dividió en las siguientes etapas:

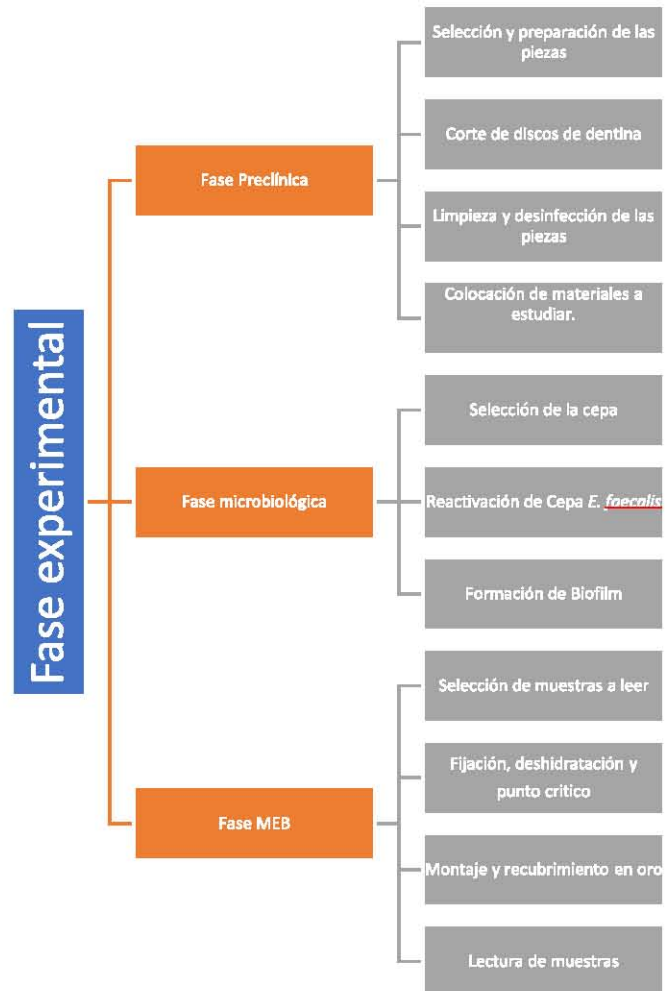


Figura.1 Diagrama de las fases experimentales.

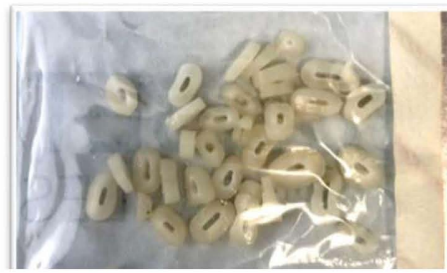
### **Primera Fase: Pre-Clínica**

- Se seleccionaron 37 dientes (premolares) extraídos por motivos de ortodoncia. El uso que se le dio al diente después de la extracción cuenta con el consentimiento de la clínica en la que se extrajo. Los dientes se recolectaron y colocaron en solución salina estéril y se almacenaron a  $-4^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.
- Se realizaron cortes separando la parte coronal y radicular de los dientes extraídos utilizando discos de diamante y carburo.
- Se obtuvieron 3 discos de dentina de cada raíz de los dientes extraídos: recolectando 125 discos de dentina en total, 30 para cada grupo de muestras y 5 discos para cada grupo de control. Se cortaron los discos de dentina con un disco de diamante a 3 mm de ancho, que simuló la medida que se realizó en una retro-obturación.
- Se realizó la simulación de la preparación apical, utilizando una fresa de diamante (E32D) con el sistema de ultrasonido (Varios NSK).
- Se aplicó desinfección de las muestras, utilizando soluciones antimicrobianas, NaOCl al 2,25%, y EDTA 17% , por 4 min en el ultrasonido Biosonic UC50 a 30 htz.(Fig. 1)
- Posterior a la desinfección con soluciones, se colocó en el ultrasonido Biosonic UC50 con agua destilada por 4 min a 30 Hertz en repetidas ocasiones hasta que no se presentó turbidez.



**Figura 1. Ultrasonido Biosonic UC50**

- Se colocaron las muestras en papel filtro para su secado y se colocaron en bolsas para su esterilización. (Fig. 2)



*Figura 2. Discos de dentina para muestras experimentales*

-Se esterilizarón los discos de dentina , junto con el material para la colocacion de lo materiales de obturación biocerámicos en Autoclave de calor humedo por 20 min a 121° C.

- Los discos de dentina se obturarón y sellarón con Biodentine, MTAG y MTAB (30 discos de dentina en cada material) y grupos control, con gutapercha, los materiales de obturación Biodentine, MTAG y MTAB y discos de dentina sin obturación. (5 muestras por cada grupo control).(Fig.3)

- El mezclado de los materiales se realizó según las indicaciones de la casa comercial. Donde el Biodentine se coloco 5 gotas de liquido con una capsula, se utilizó el amalgamador para su mezclado por 30 seg. EL mezclado del MTA Gris y Blanco se realizó proporción 2:1 liquido-polvo por 40 segundos.(Fig. 4)



*Figura 3. Material se expuso 15 min, a luz UV en campana de flujo laminar.*



*Figura 4. Colocación de material de obturación en grupos experimentales.*

Los grupos experimentales se dividieron de la siguiente manera (Tab.1) :

Tabla 1. En la siguiente tabla se muestran los grupos experimentales con sus respectivos controles.

TIEMPO	GRUPOS EXPERIMENTALES BIOFILM <i>E. FAECALIS</i>			GRUPO OBSERVACIONAL BIOFILM <i>E. FAECALIS</i>		CONTROLES NEGATIVOS SIN INOCULACIÓN				
	MTA GRIS	MTA BLANCO	BIODENTINE	GUTAPERCHA	DISCO DE DENTINA	MTA G	MTA W	BIODENTINE	GUTA PERCHA	DISCO DE DENTINA
21 Días	N=30 Discos De Dentina	N=30 Discos De Dentina	N=30 Discos De Dentina	N=5 Discos De Dentina	N=5 Discos De Dentina	N= 5 Discos De Dentina				

## Segunda Fase: Microbiológica

### Reactivación de la Cepa de *E. faecalis*

En el proyecto se utilizó como microorganismo *E. faecalis*. el cual se obtuvo del cepario del laboratorio de la Maestría en Endodoncia UASLP los cuales fueron aislados de pacientes con periodontitis apical persistente. *E. faecalis* se almacena en agar solidificado en pico de flauta a 4° C en refrigeración. (Fig. 5)



Figura. 5 Cepario del laboratorio de la Maestría en Endodoncia, UASLP.

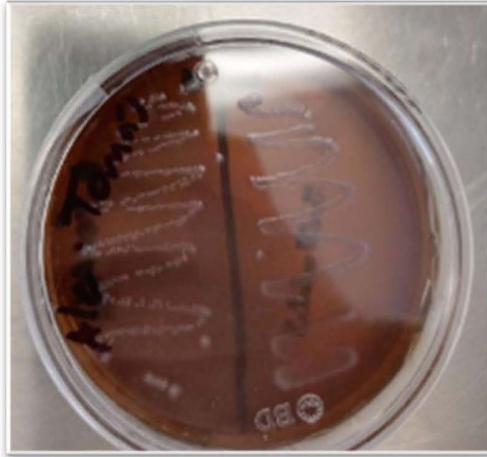
Se seleccionarán 4 cepas de *E. faecalis* para su reactivación con el fin de utilizar la de mayor grado de identificación.

En ambiente estéril, utilizando la campana de flujo laminar, Se tomó una muestra del microorganismo y se sembró en el tubo con medio de cultivo estéril BHI distribuyéndolo todo por el medio.

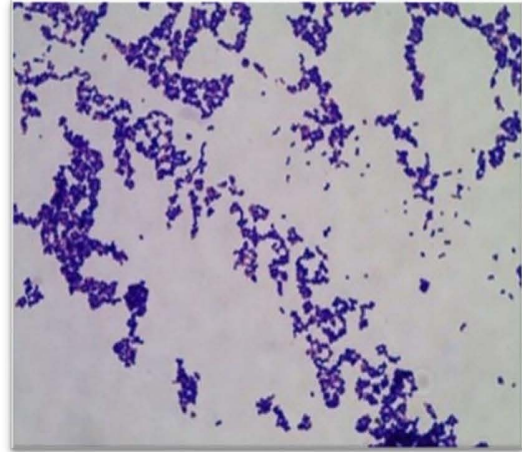
Los tubos se sometieron a un periodo de incubación por 48 hrs. a 35° C +-2, en una estufa bacteriológica.

Posterior a las 48 hrs. del tubo que mostro mejor desarrollo se seleccionó para llevar a cabo la fase experimental, para mantener al microorganismo se sembró en una placa de agar sangre, realizando resiembras para mantener al microorganismo viable hasta su utilización. (Fig. 6)

Se realizó la observación macroscópica del desarrollo de las colonias por medio del microscopio estereoscópico a una magnificación de 40x, posteriormente se realiza la observación microscópica realizando tinción de gram en microscopio óptico a una magnificación de 100x. (Fig. 7)



*Figura 6. Siembra en placa Agar Sangre de E. faecalis*



*Figura 7. Tinción de Gram de E. faecalis*

Posteriormente se realizó la identificación por medio del sistema API 20 Strep, la cual dio un resultado de identificación del 99%.

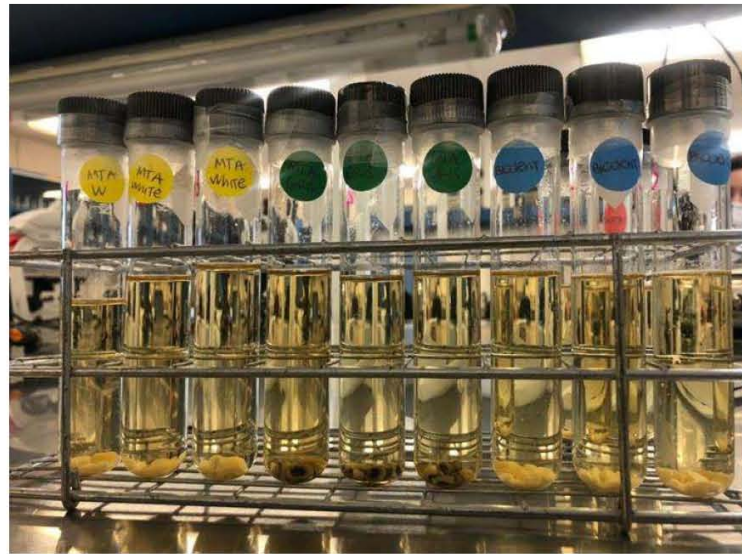
### **Formacion de Biofilm por Método Estático**

Una vez reactivada la cepa se prepara un inóculo del microorganismo *E. faecalis* a una escala de McFarland de 0.5 ( $1.5 \times 10^8$ / ml), donde se comprobó con el espectrofotometro a 625 nanometros con una equivalencia de .085 unidades de absorción. (Fig. 8)



*Figura 8. McFarland de 0.5 ( $1.5 \times 10^8$ / ml)*

Una vez preparados todos los tubos correspondientes a cada grupo con el medio de cultivo (BHI), se colocó 200 ul del inoculo de *E. faecalis*, y posteriormente se colocarán los discos de dentina ya con el material a experimentar. Donde se incubarán por 48 hrs a 37° C. (Fig. 9)



*Figura 9. Tubos de medios de cultivo inoculados de E.faecalis.*

Este procedimiento se repitió durante 21 días, realizando recambios del medio de cultivo cada 48 horas. Estos recambios consistían en cambiar los discos de dentina a un nuevo tubo con 30 ml de medio de cultivo estéril.

Todos estos procesos se realizaron en un ambiente estéril dentro de la campana de flujo laminar (LABCONCO) (Fig.8 )



*Figura 8. Campana de Flujo Laminar  
LABCONCO*

### **Tercera Fase: Microscopio electrónico de barrido**

- Preparación de muestras biológicas para la lectura en microscopio electrónico de barrido.

#### *Fijación.*

La fijación se realizó sumergiendo las piezas en glutaraldehído grado reactivo al 2,5% con azul de alciano al 2%, durante 24 hrs a 4°C. Una vez concluido este periodo se retiraron de la solución y se enjuagan con solución salina para su posterior deshidratación. (Fig. 9)



*Figura 9. Fijación de muestras con glutaraldehído al 2% con azul de alciano 1%*

#### *Deshidratación.*

Las muestras se deshidratarán por medio de una serie de alcoholes creciente, iniciando con alcohol etílico al 20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 95%, por 10 minutos cada uno, y finalmente en alcohol absoluto para realizar el proceso de punto crítico . (Fig. 10)



*Figura 10. Deshidratación de las muestras experimentales*

***Proceso de Punto Crítico***

Las muestra se sometieron posteriormente a un secado de punto crítico (Fig.11)



**Figura 11. Secado de Punto Crítico  
Leica EM CPD 030**

***Recubrimiento de Oro.***

-Las muestras fueron montadas y selladas con cinta de carbono en dispositivos o pines para su lectura donde en el Fine Coat Ion Sputter JFC1100 JEOL, se realizó el baño de oro por 80 seg.

-El baño de oro es necesario para la visualización por MEB, ya que este tiene una carga positiva que ocasiona un reflejo al chocar con los electrones que dispersa el filamento de tungsteno del Microscopio, proporcionandonos una imagen tridimensional con distintas magnificaciones.

***Lectura en Microscopio Electrónico de Barrido.***

- Se evaluarán por MEB la presencia de biofilm sobre la superficie de los discos, en diferentes escalas de resolución 20x, 2500x y 5000x. (Fig. 12)

Se evaluarán y observarán los resultados por SEM, luego de 21 días de cultivo bacteriano; Se seleccionarán aleatoriamente de cada grupo de 30 muestras, 11 muestras representativas para realizar la lectura y análisis en el MEB.



**Figura 12. Colocación de muestras en  
MEB**



## Resultados

Los resultados de los grupos estudiados se analizaron de la siguiente manera: Observación y análisis al MEB de los grupos experimentales y grupos controles.

Las muestras experimentales como los controles se observaron posterior a un período de 21 días de incubación bacteriana con *E. faecalis*, donde se desarrolló un biofilm. Se llevaron las muestras al microscopio electrónico de barrido (MEB) a observación con electrones secundarios a 5 kilovoltios, y a distintas magnificaciones, las cuales fueron de 18x, 20x, 2500x, y hallazgos ópticos a 3000x y 5000x. Se evaluarán distintas superficies de los discos de dentina, las cuales fueron las superficies de los materiales y la interfase de estos con la dentina. Se muestran a continuación muestras representativas de cada grupo.

### IMÁGENES DE MTA GRIS

Control MTA Gris

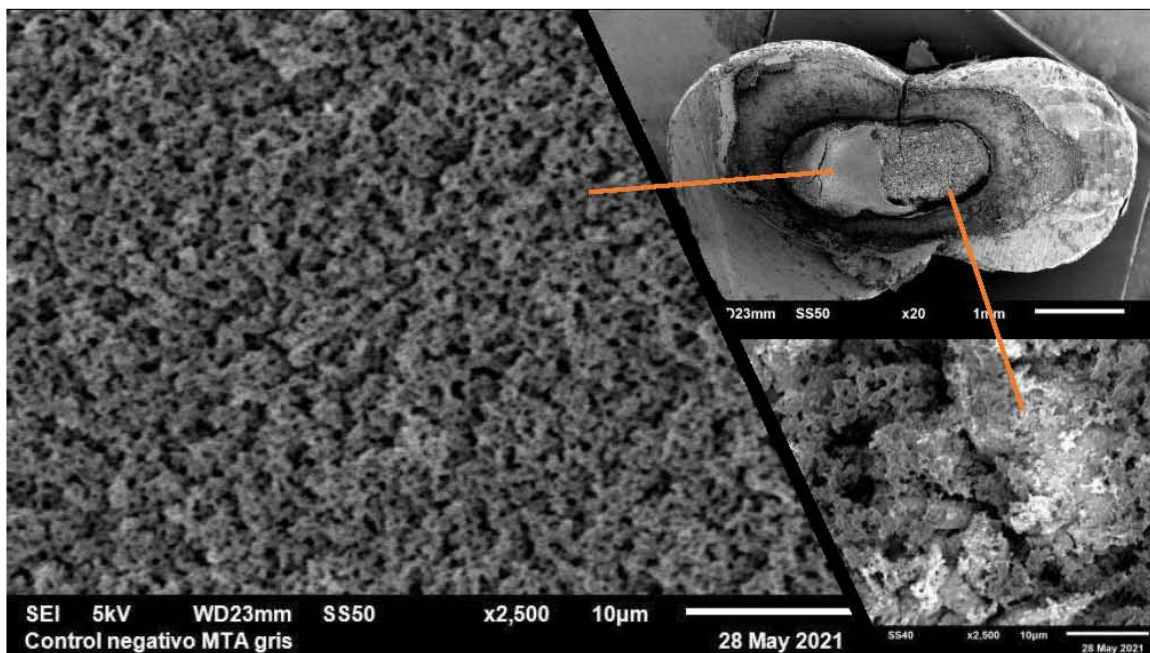
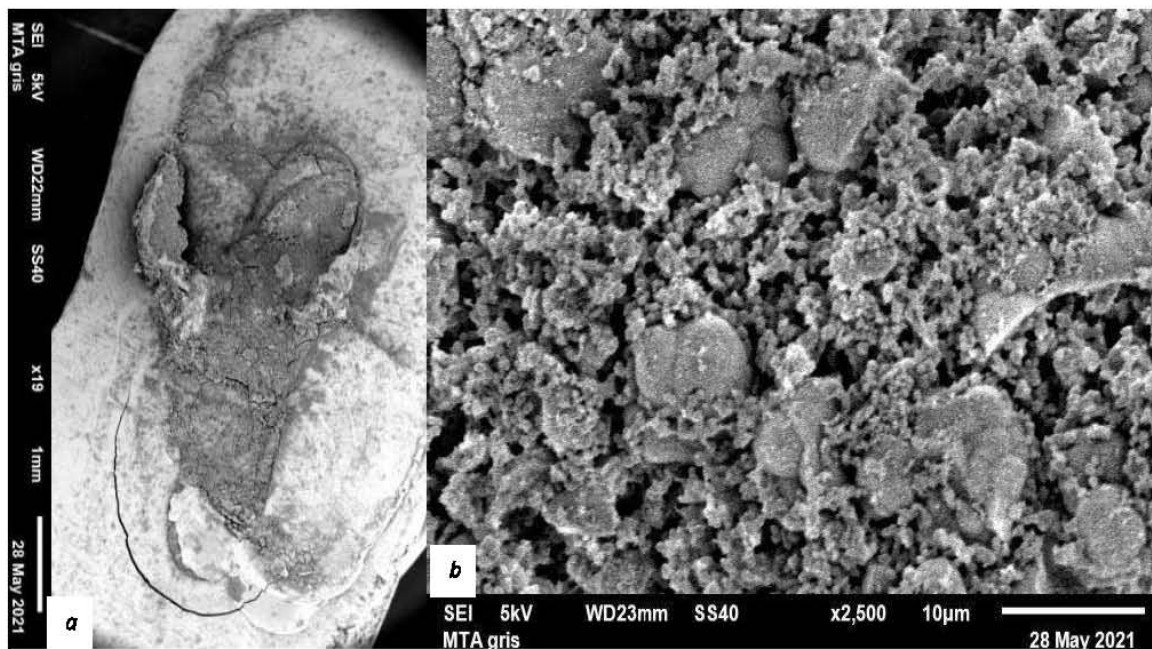


Figura 13. Muestra de Control Negativo de MTA Gris

En la imagen se observa la pieza de disco de dentina entera con material de obturación MTA Gris a una escala de magnificación de 20x a 5 kilovoltios, en la cual sobre se puede percatar distintas

topografías del material, una lisa y una rugosa; del lado derecho se aprecia la superficie rugosa la cual se pueden diferenciar distintas grietas que se dirijen a los extremos de la superficie. Al realizar una magnificación de 2500x sobre esta superficie, se observan figuras abultadas amorfas con superficie rugosa y granulada, las cuales tienen una profundidad que hacen los canales de las grietas que se observan a 20x, a la profundidad de estos canales se pueden observar la continuacion de los granulos. A estas mismas magnificaciones el lado izquierdo, la superficie lisa, se puede observar sin estos canales o grietas pero sí con una superficie uniforme y constate. A pesar de estas diferencias las rugosidades y granulaciones son las mismas en las dos superficies. (Fig. 13)

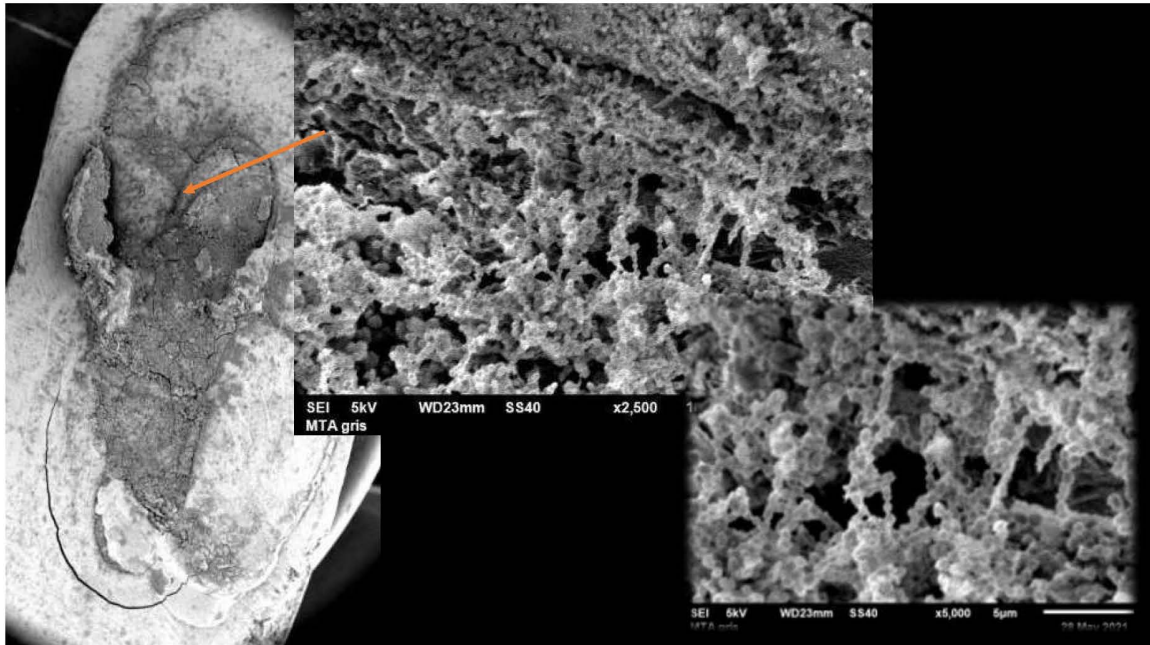
#### Muestra Experimenta MTA Gris #1



*Figura 14. Muestra de MTA Gris a magnificaciones de 20x (a), y 2500x (b), donde se pueden apreciar los cocos en contacto con superficie del material.*

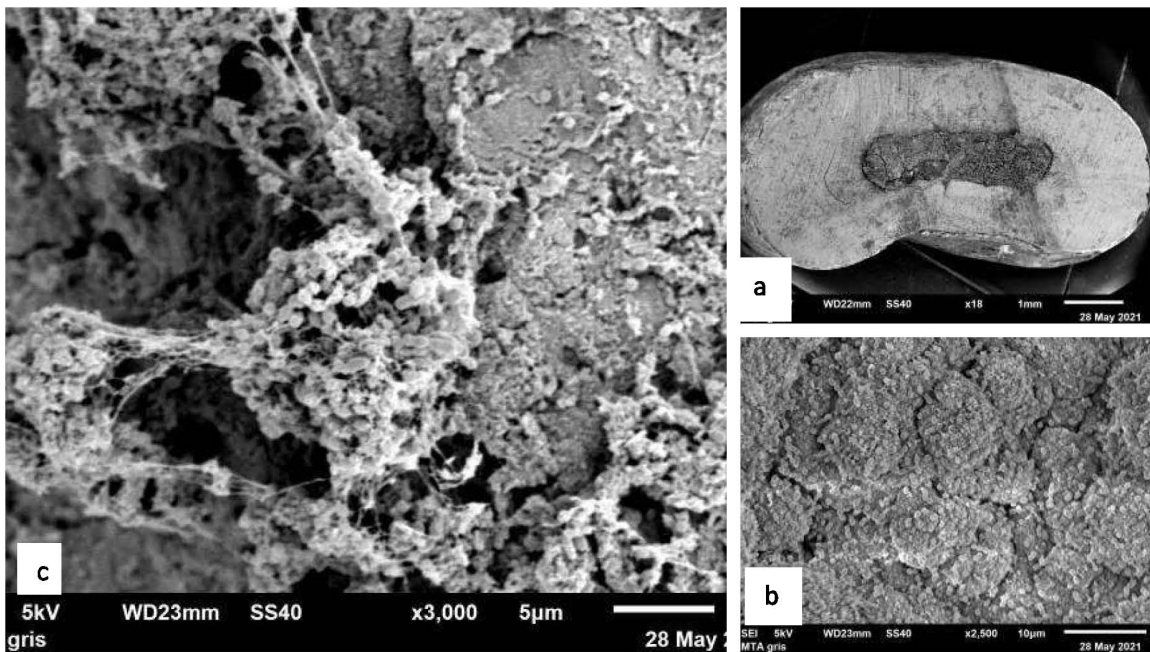
Aquí mismo en la muestra 1, de MTA Gris, se observa al igual que nuestro control negativo en una magnificación de 20x , distintas topografías, lisas y rugosas, donde ya se puede observar la integración de los microorganismos con el material. A una magnificación de 2500x podemos observar los distintas formas de cocos en colonias en toda la superficie del material observado, al irnos a la interfase, se puede observar protuberancias de forma cocoides en redes tratando de unirse de un lado a otro, donde en un extremo se encuentra la dentina y el otro el material de obturación, en estas redes a una magnificación de de 5000x, se puede observar como el

microorganismo esta realizando un cierre para crear una conexión entre las superficies. (Fig. 14 y 15)



*Figura 15. Interfaz del material de obturación MTA Gris con la dentina, conexiones en forma de cadena lineal de E. faecalis*

### Muestras Experimental MTA Gris #2



*Figura 16. Muestra de MTA Gris a magnificaciones de 18x (a), y 2500x (b), donde se pueden apreciar los cocos en contacto con superficie del material. Magnificación a 3000x(c), donde se aprecia la matriz de polímeros extracelular creando una estructura más definida.*

En la micrografía de lado derecho superior observamos la pieza completa del disco de dentina con material de MTA gris. Sobre la superficie del MTA se puede observar distintas superficies con aspectos lisos y rugosos, al igual que se pueden encontrar relieves sobre las mismas. Todo esto observado bajo una magnificación de 18x. En una magnificación de 2500x sobre la superficie rugosa se encuentran acúmulos amorfos de apariencia solida a desniveles en los cuales se aprecian estructuras típicas del *E.faecalis* la cual es de forma redondeada o cocoide. Sobre esta misma superficie se encuentran fisuras en las que hay asentamientos del microorganismo.

En la imagen del lado izquierdo, bajo una magnificación de 3000x sobre la interfaz del material de obturación con la dentina encontramos aglomeraciones de *E.faecalis* que se encuentran en formas de racimos y cadenas rodeados por una matriz de polímeros extracelular, la cual llega a conectar con otros acúmulos de *E.faecalis*. El observar este polímero extracelular nos puede llegar a indicar que existe una actividad metabólica y una comunicación de bacteriana. (Fig. 16)

### Muestra Experimental MTA Gris #3

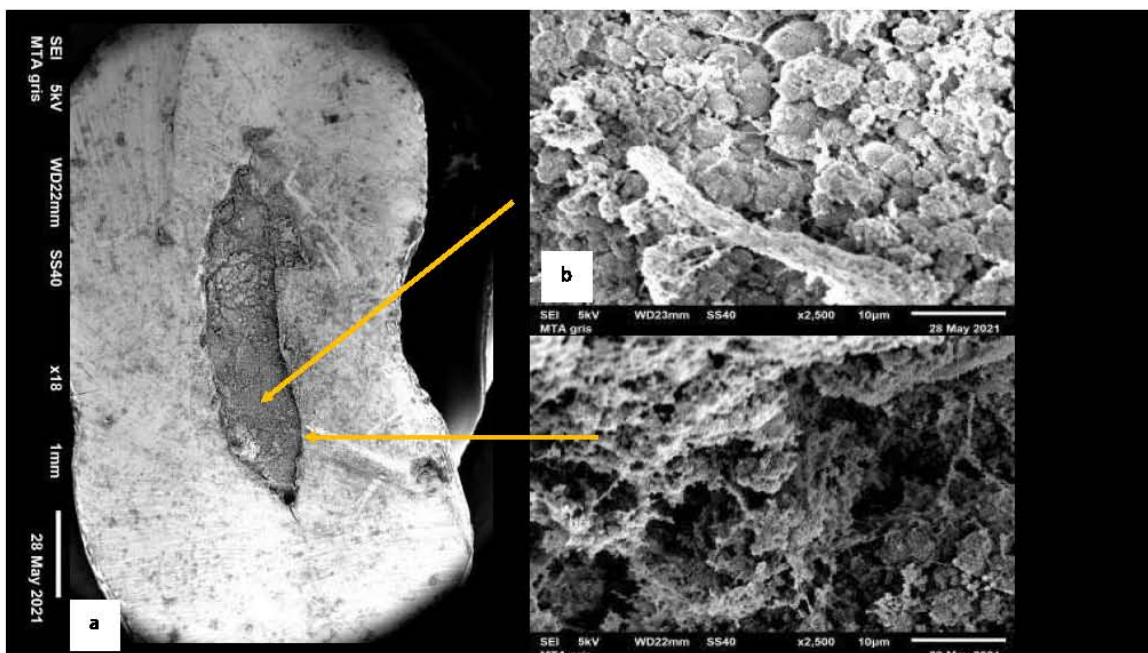
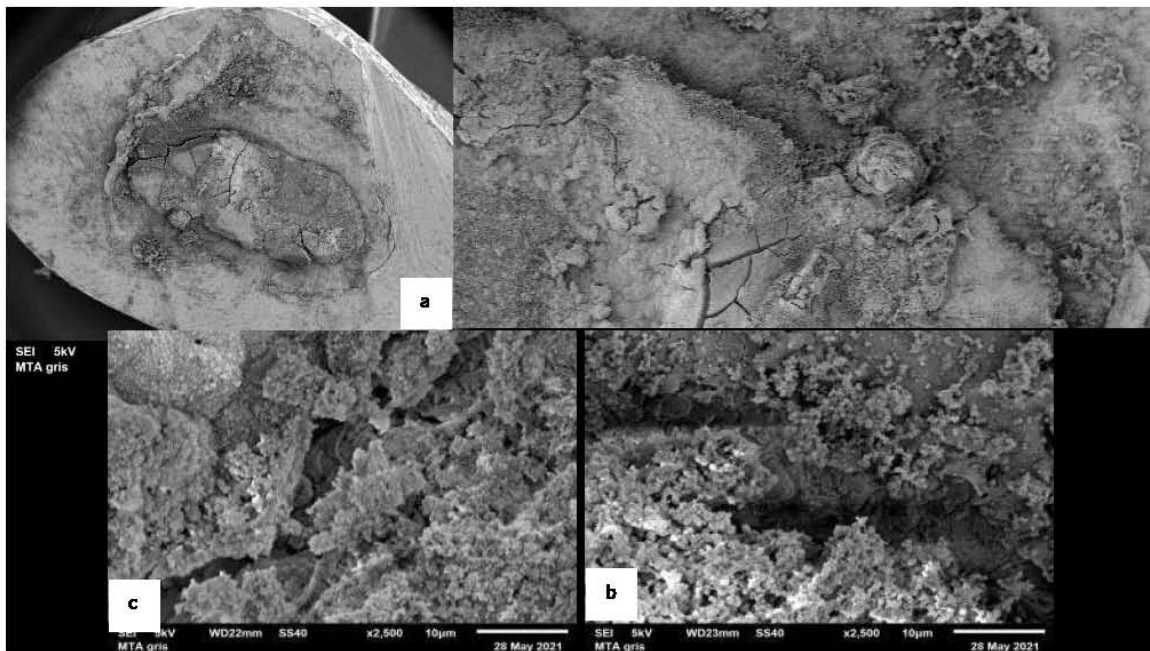


Figura 17. Muestra de MTA Gris a 18x (a), magnificación 2500x, donde se observa estructura lineal de matriz extracelular formada por cocos (b)

En la micrografía de lado izquierdo se aprecia la pieza entera con MTA gris en el lumen del disco de dentina, la superficie del material cuenta con un aspecto rugoso y agrietado. En una magnificación de esta a 2500x se aprecian aglomeraciones de acúmulos redondeados repletos de estructuras cocoides y filamentos de matriz extracelular en esta misma se puede observar un patrón distinto a los antes observados ya que en este los microorganismos formaron una estructura alargada

multicapa rodeada de una matriz de polímero extracelular. En la interfase del MTA gris con la dentina vemos cadenas formadas por cocos, las cuales tienen algunas que logran formar puentes entre estas dos superficies. (Fig.17)

#### Muestra Experimental #4 MTA Gris



**Figura 18.** Muestra de MTA Gris a 18x (a) con una magnificación de la superficie del material. Magnificación 2500x, donde se observa racimos de cocos en toda la superficie del material (b), magnificación de la interfaz a 2500x.(C)

En la imagen del disco de dentina a 18x que se encuentra del lado derecho superior se aprecia el material de MTA gris en el centro de este al igual que en parte de la superficie de la dentina, que esto pudo haber sido causado por el desprendimiento del material durante su manipulación. En la superficie del MTA de la parte central del disco de dentina se observan distintas topografías con distintos patrones de rugosidad los cuales ayudan al sedimento del *E.faecalis*. En la magnificación de 2500x se observan interacciones de los microorganismos o de las estructuras cocoides con el material formando pequeños racimos, cadenas y pequeñas aglomeraciones de estos. Esto mismo se aprecia en la imagen de lado izquierdo inferior la cual corresponde al interfaz del material con la dentina teniendo el mismo patrón de cadenas, racimos y aglomeraciones. (Fig. 18)

**IMÁGENES DE MTA BLANCO**

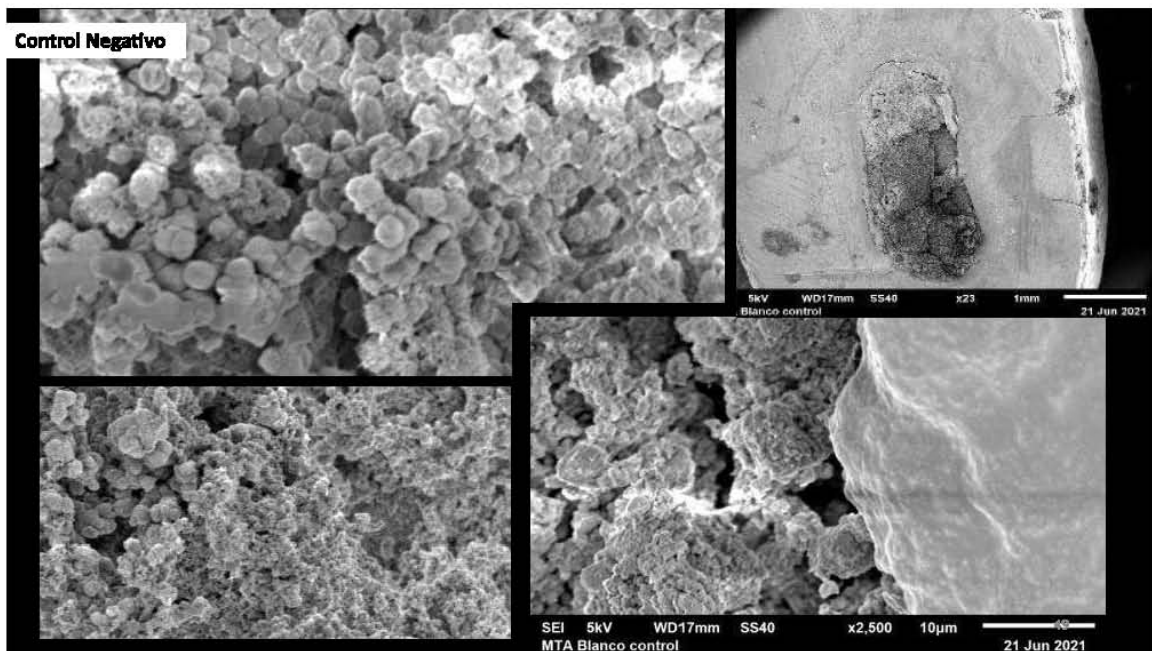


Figura 19. Muestra control negativo de MTA Blanco

En la micrografía en MEB del Material MTA Blanco, podemos observar en el disco de dentina control, que en la pieza completa que se logra a ver del lado derecho superior a una magnificación de 23x las superficies tienen aspecto rugoso, craqueado y puede parecer zonas más lisas que otras. Si ampliamos la escala de magnificación a 2500x, podemos observar el material con un patrón irregular, con superficies rugosas y con nichos profundos. A diferencia de las muestras constaminadas con *E.faecalis* las superficies granulosas e irregulares no muestra ninguna rastro de una matriz extracelular. (Fig. 19)

Muestra experimental #1 MTA Blanco

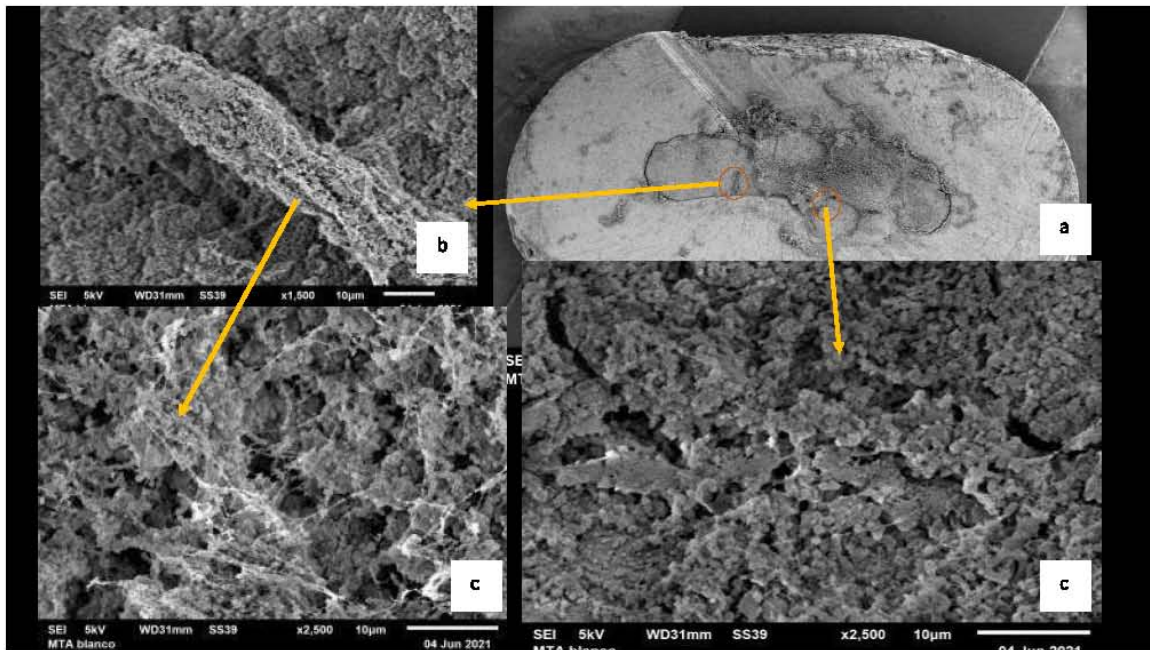
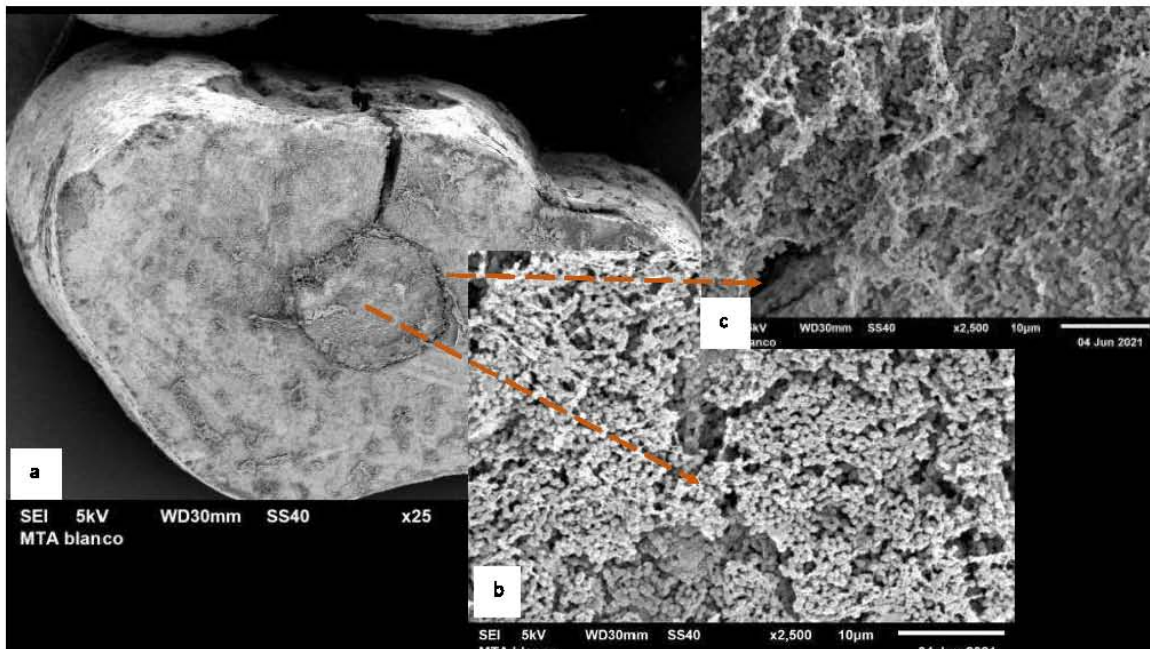


Figura 20. Disco de dentina con MTA Blanco, magnificación de 16x (a), 1500x (b) y 2500x (c) de la superficie del material de obturación. Magnificación a 2500x de la interfaz del material con la dentina (c).

En la micrografía del MTA Blanco contaminado de *E.faecalis* a una magnificación de 16x podemos apreciar el disco de dentina entero, en donde se pueden observar distintas topografías del material, la cual también se llega a expandir o estar presente en parte de la dentina, continuando con las variantes de la topografía que son, lisas, rugosas y con relieve. En la parte central donde se encuentra la topografía rugosa con relieve, podemos ver a una magnificación de 1500x, que esta cuenta con pequeñas abultaciones con un patrón constante, de manera rugosa, pero al igual podemos encontrar estructuras con relieve de manera longitudinal, la cual se puede apreciar en ella redes entrecruzadas en toda su superficie, con rugosidades y porosidades. Al realizar una magnificación a 2500x sobre esta estructura se ve como esas redes están conectadas con estructuras cocoides que cuentan con las características de *E.faecalis*, donde puede coincidir esta red con las características de los polímeros extracelulares. Estas redes con cocos se pueden apreciar en toda la superficie al igual que en las porosidades o espacios más profundos se pueden seguir apreciando, creando así una estructura multicapa de estas redes. En la zona del interfaz de la dentina con el material de obturación podemos ver como la superficie se encuentra repleta de

estructuras cocoides conectadas entre si, formando alienaciones binarias y en cadena. En esta se puede observar una leve separacion del material con la dentina qu puede ser debido a la colonizacion de las bacterias y su conección de un material a otro. (Fig. 20)

#### Muestra Experimental #2 MTA Blanco



*Figura 21. Disco de dentina con MTA Blanco, magnificación de 25x (a), y 2500x (b)de la superficie del material de obturación. Magnificación a 2500x de la interfaz del material con la dentina (c).*

En la micrografía a 25 x donde se puede apreciar la pieza entera donde en el centro se encuentra el materil de obturación MTA Blanco, donde tambien este se puee encontrar sobra la superfie de la dentina, el cual puede ser desprendimiento de este al entrar en contacto con el medio de cultivo, la superficie del material se puede ver de manera uniforme con ciertos relieves en la zona periferica donde tiene unión con a la dentina, al realizar un aumento a 2500x sobre la superficie del material se observa como los en esta se encuentra repleta de estructuras de forma cocoides en agrupaciones de racimos y en cadenas, en la interfaz a la misma magnificación se pueden observar estos racimos y cadenas en las cuales se observan estructuras lineales rodeandolas formando unidades mas completas las cuales coinciden con una matriz de polimeros extracelular las cuales ayudan a crear redes para la colonizacion y maduración de este, en la interfaz estas redes un material con otro.(Fig. 21)



### Muestra Experimental #3 Mta Blanco

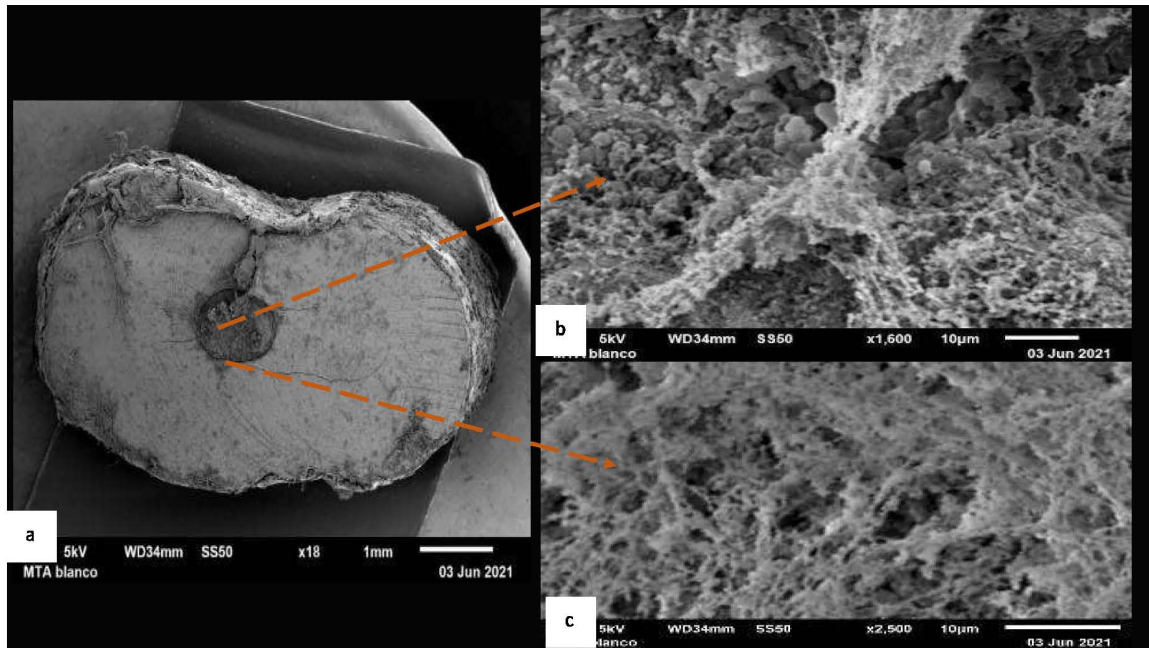


Figura 22. Disco de dentina con MTA Blanco, magnificación de 18x (a), y 1500x (b) de la superficie del material de obturación. Magnificación a 2500x de la interfaz del material con la dentina (c).

En la imagen se puede apreciar a la izquierda el disco de dentina completo el cual al centro se puede indentificar el material de obturación MTA Blanco donde a una magnificación de 18x, se aprecia una topografía irregular con relieves lisos, en la superficie de la dentina se puede observar una superficie regular con ciertas grietas, las cuales pueden llegar a ser formación de biofilm, ya que observando la periferia del disco se ve una masa uniforme con irregularidades que abraza la periferia y continua sobre la superficie de la dentina hasta llegar al lumen del disco donde se encuentra el material de obturación. A una magnificación de 1600x sobre la superficie del material, podemos observar que en las irregularidades de los relieves de esta, se encuentran formas estructuradas de cocos, creando alineaciones que en conjunto crean masas de redes rodeadas de polímeros que ayudan a estas alineaciones de cocos a estar en contacto, sobre esta misma estructura a 2500x de magnificación se pueden apreciar de mejor manera estas alineaciones de los cocos, creando cadenas y redes, creando una estructura tridimensional, en los espacios o porosidades de estas estructuras se pueden apreciar más formas cocoides en las profundidades así dando un aspecto de multicapas. (Fig. 22)

#### Muestra Experimental #4 MTA Blanco

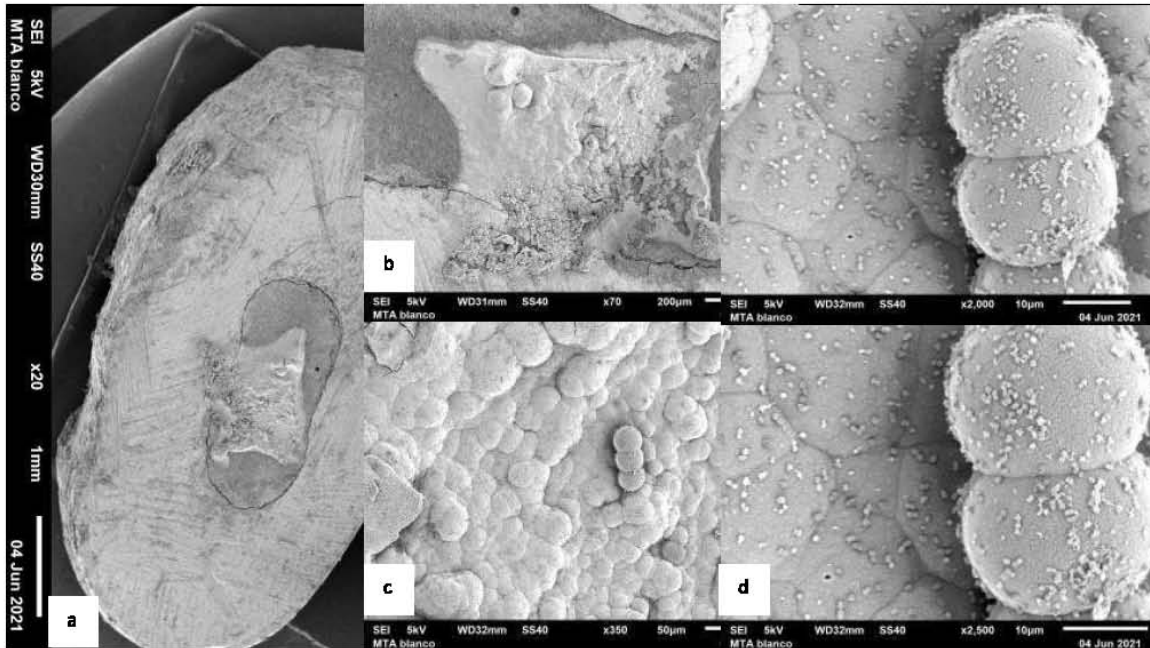
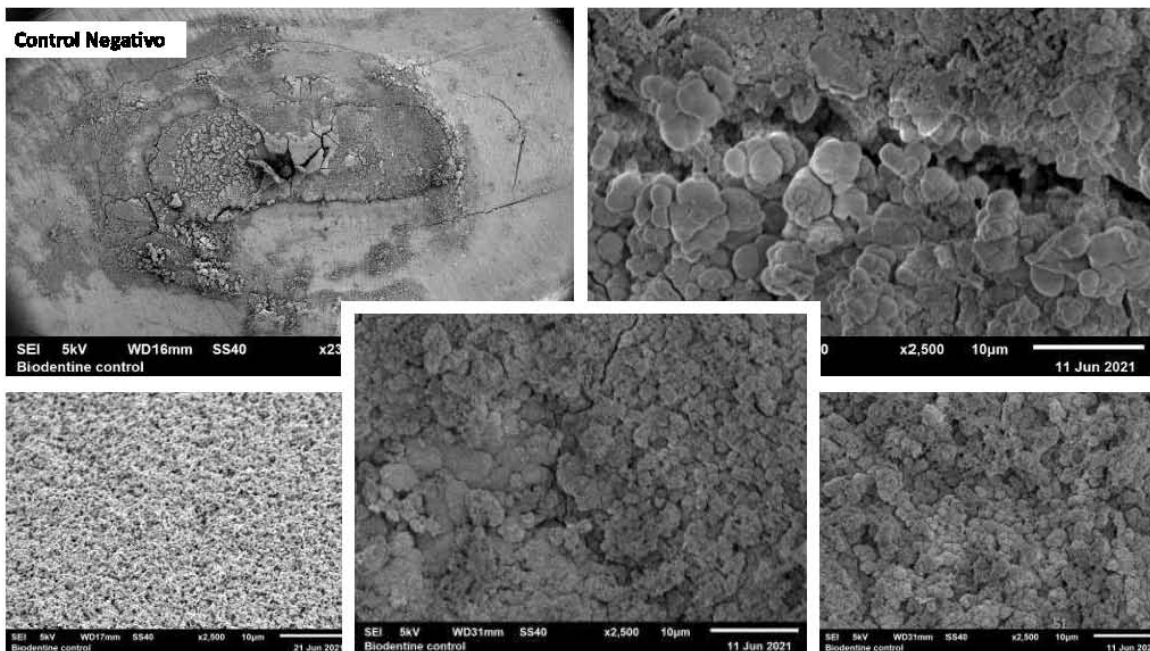


Figura 23. Disco de dentina con MTA Blanco, magnificación de 20x (a), 78x (b), 350x (c) y 2500x (d) de la superficie del material de obturación.

En la micrografía se muestra como la topografía del material en conjunto los microorganismos puede variar mucho, ya que en una imagen a 20x, en la parte izquierda se puede observar el disco de dentina entero en donde el lumen al centro del disco se encuentra obturado con MTA Blanco, y se observa en el una superficie de distinta coloración y con un relieve uniforme en la parte central, la cual podría ser material desprendido por el flujo existient durante el periodo o formación de biofil maduro, esta superficie se puede observar con rugosidades y al realizar una magnificación sobre estas dos superficies de distintos colores, podemos ver como las superficies cuentan con distintas topografías, siendo la mas luminosa o blanca la que cuenta con fisuras, relieves uniformes y abultaciones amorfas de apariencia solida y lisa, en estas abultaciones se realiza una magnificación a 350x para observarlas con mayor claridad en la cual encontramos, esta superficie uniforme (zona con abultaciones redondeadas amorfas, de apariencia solidas y lisas). A una magnificación de 2500x, podemos observar que la superficie de estas abultaciones es de manera uniforme con rugosidades las cuales estan cubiertas por microorganismos de forma cocoide, donde se puede aprecias como

estos están en duplicación o en formación de cadenas, así dando la apariencia de que están en desarrollo. (Fig. 23)

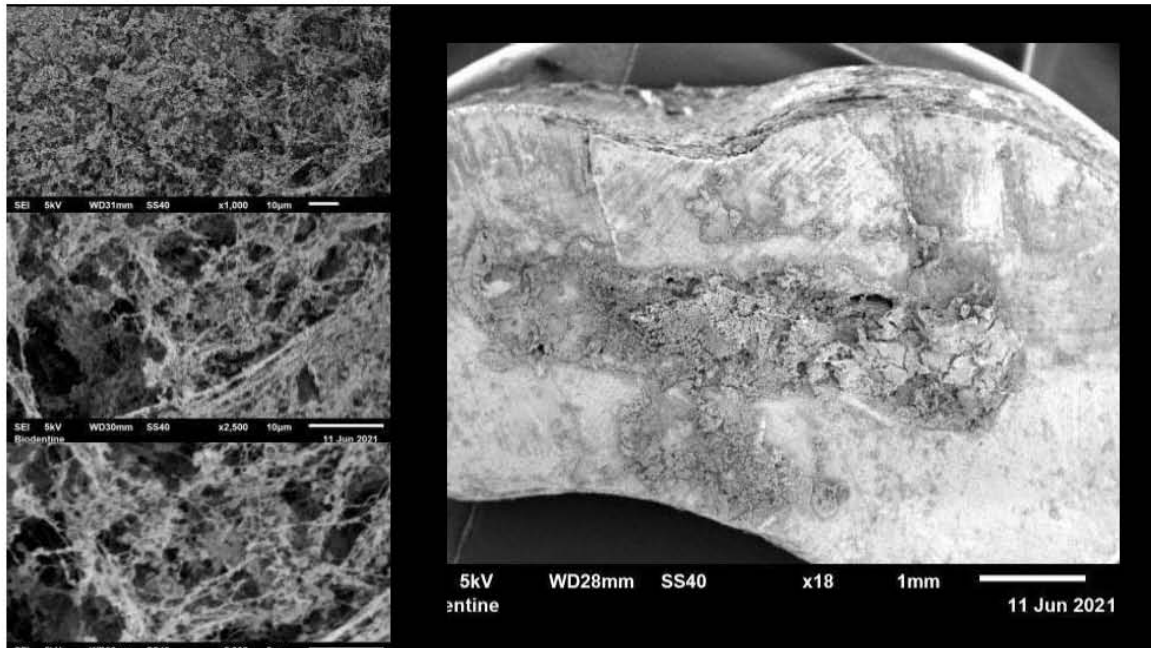
### **BIODENTINE**



**Figura 24.** Muestra control negativo de Biodentine. Se muestran distintas topografías encontradas en la superficie del material de obturación.

En la imagen del material de Biodentine se puede ver que en el disco de dentina completo a un aumento de 23x este se puede llegar a presentar con distintos tipos de topografías, rugosas, lisas, uniformes y con relieves, al igual que si observamos en la superficie de la dentina podemos observar rastros del material, con la misma topografía. Al realizar un aumento en la magnificación de la imagen en las distintas superficies, podemos ver que a 2500x en una superficie rugosa podemos observar como el material consta de forma granulada, compacta y lisa. Pero a pesar de estas características, esta causa una superficie muy rugosa con microporosidades. En una magnificación a 2500x de la superficie más uniforme, podemos observar las mismas características del material, al igual que formando la superficie rugosa, pero en esta zona lo único que se modifica es la uniformidad de la superficie. (Fig. 24)

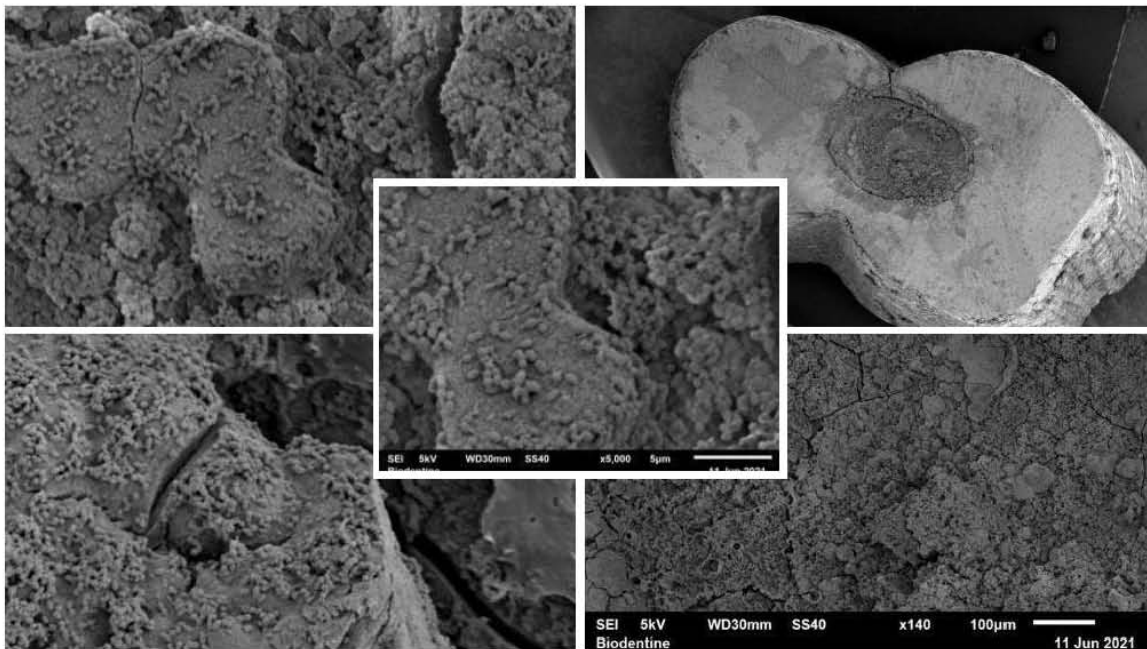
**Muestra Experimental #1 Biodentine**



*Figura 25. Disco de dentina con Biodentine, magnificaciones 18x, 1000x, 2500x y 500x*

En la micrografía se puede observar de lado derecho la pieza del disco de dentina con material de obturación de biodentine en donde su superficie cuenta con una topografía irregular desde el centro de esta hasta sus periferias, estando en estas los relieves mas marcados, pudiendo ser un acomodo del material o desprendimiento de este despues de entrar en contacto con el medio de cultivo, en una magnificación de 1000x sobre esta superficie se puede apreciar una superficie con redes y pequeñas rugosidades amorfas que parecen formar abultamientos de microorganismos, al realizar una magnificación de 2500x, podemos observar la forma redondeada que coincide con la de *E. faecalis* excretando polimeros de matriz extracelular los cuales se observan como filamentos blanquecinos de estructura delgada rodeados o incrustados por mas estructuras cocoides que crean redes entre agrupaciones de bacterias, lo cual se podria decir que estan uniendose para formar una estructura mas solida y estable de biofilm, al igual que esta ayuda a su comunicacón y organizaciòn para su desarrollo. (Fig. 25)

**Muestra Experimenta #2 Biodentine**



**Figura 26.** Disco de dentina con Biodentine, magnificaciones 18x, 140x, 2500x y 5000x, Interfaz de material de obturación con disco de dentina 2500x.

En la siguiente muestra se puede observar la pieza del disco de dentina con aterial de obturación de Biodentine en el cual la superficie se observa rugosa e irregular, en las irregularidades se hizo una magnificación a 140x donde se puede apreciar mejor como la topografía del material consta de una superficie homogénea, con porosidades y grietas en la superficie, que esta puede tener relieves en las cuales se realiza otro acercamiento a 2500x, y se puede observar una forma de 8 de material el cual se encuentra repleto de microorganismos que si se observar con detalle se puede ver como estos se encuentran en fase de división el cual consta de la fase de colonización, al igual estos se observan en cadena, lo cual la literatura menciona que esta puede ser parte de una comunicación de enlace corto, o simplemente una organización estructural para su adherencia a la superficie y colonización. En la interfaz a una magnificación de 2500x, se puede observar como en el material y la dentina hay microorganismos pero no se aprecia una conexión íntima entre los materiales, ya que si se puede valorar la división por un canal. En este canal a la profundidad se puede observar microorganismos cocoides pero sin ninguna filamento de matriz extracelular. (Fig. 26)

### Muestra Experimental #3 Biodentine

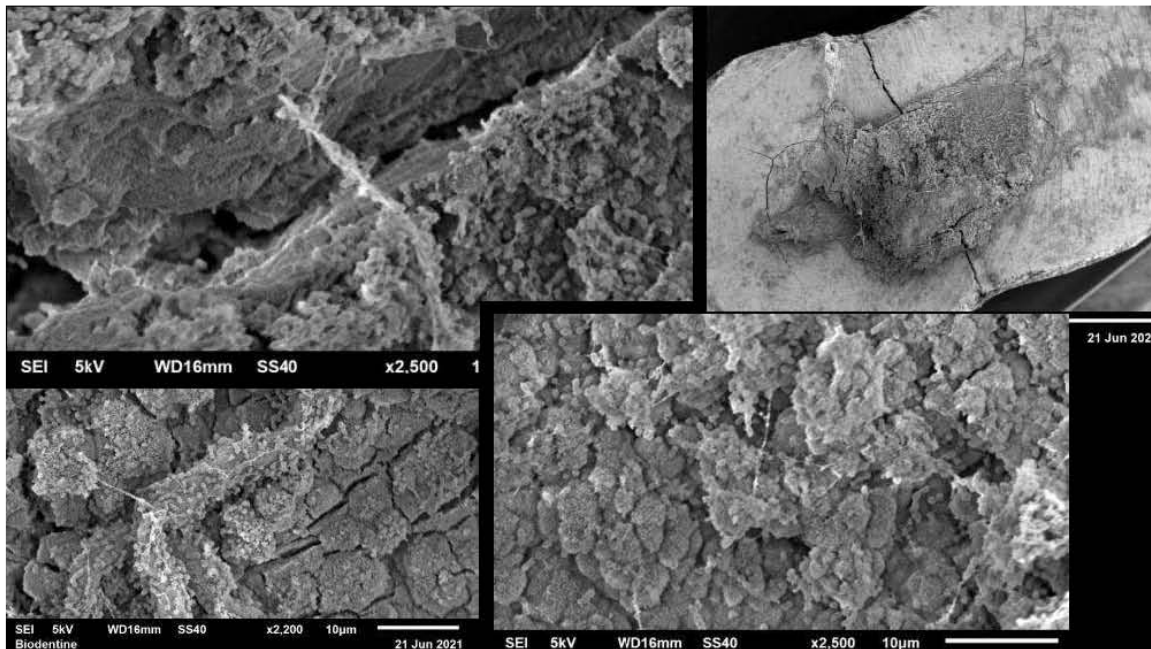


Figura 27. Disco de dentina con Biodentine.

En la micrografía a una escala de 20x se puede observar la pieza de dentina completa donde el material de obturación de Biodentine se encuentra al centro de ella, con una superficie irregular y abultada con relieve, el cual tiene apariencia agrietada. Al igual que a sus alrededores se puede observar sobre la superficie de la dentina material de biodentine que posiblemente fue desprendimiento de este al momento de entrar en contacto con el medio de cultivo creando erosión y desprendimiento hacia otras partes. A una magnificación de 2500x podemos observar que el aspecto agrietado del relieve son aglomeraciones bacterianas de forma amorfa que están tomando un aspecto más compacto y sólido, lo cual sobre este se puede ver rugosidades que pueden ser los mismos microorganismos compactados sobre estas superficies. En la interfaz del material con la dentina a 2500x de magnificación que es la imagen superior izquierda, se puede apreciar como hay una separación entre el material y la dentina, pero a pesar de este se observa una cadena de microorganismos con filamentos de polímeros extracelular que toman rumbo para las superficies tratando de crear una conexión entre ellas. (Fig. 27)

#### Muestra Experimenta #4 Biodentine

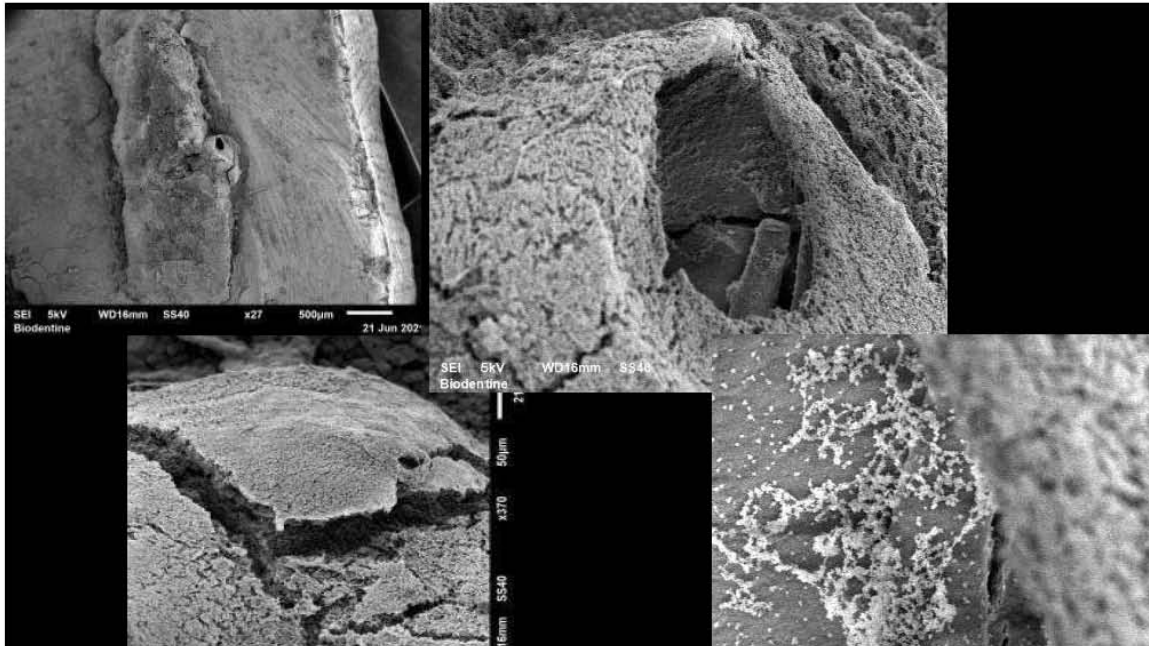


Figura 28. Disco de dentina con Biodentine. Se puede apreciar a una magnificación a 450x como hay un Biofilm multi-capa que crea una estructura de cráter, en donde a su profundidad a 2000x se puede ver las estructuras de *E. faecalis* formando racimos cadenas y redes con polímeros extracelulares.

En esta muestra experimental de Biodentine se puede observar como a 20x, en el disco de dentina entero, un relieve irregular con rugosidades muy marcado en toda la superficie del material, creando un cráter. Al realizar una magnificación en este a 450x, se puede observar en la periferia como se ha formado un biofilm multicapa ya que se aprecia estructuras redondeadas y porosas, las cuales a una magnificación a 2000x, comprobamos esto sobre su superficie al igual que a la profundidad, ya que se observa la estructura típica de *E. faecalis* redondeada y alargada, la cual crea cadenas, racimos y redes con polímeros extracelulares, creando microcolonias.

\*\*\*Vease Anexo 1 donde se encuentran todas las lecturas de los grupos experimentales en el MEB, teniendo un patrón similar en el crecimiento de biofilm sobre las tres superficies de los materiales de obturación.

## **Discusión**

Dentro de los tratamientos endodónticos, la cirugía apical o apicectomía tiene como objetivo disminuir o eliminar la invasión bacteriana persistente, así al igual que sus productos tanto como dentro del conducto radicular como la porción externa de la raíz. La colonización bacteriana es un proceso activo, en el cual es llevado a cabo por un grupo polimicrobiano en constante comunicación y crecimiento. Los microorganismos anaerobios facultativos son los más frecuentes en este tipo de infecciones persistentes, siendo uno de los principales encontrados *E. faecalis*. Por su capacidad de sobrevivencia, adherencia a superficies (serina, proteasa y proteína de unión a colágeno) y de formación de biofilm este se encuentra entre un 24-77% en los cultivos aislados de un tratamiento endodóntico fallido. (Song, Kim, Lee, Kim, & Kim, 2013; Tsesis et al., 2017)(Beltran-Leal et al., 2020)

Se ha visto a lo largo del tiempo modificaciones en los materiales dentales, dándoles propiedades y características basadas en las necesidades de los odontólogos. Hoy en día los biocerámicos son materiales de elección por tener características como, mayor biocompatibilidad con tejidos vitales, pulpa dental, cemento, dentina, periodonto, tejido óseo, etc. Los materiales biocerámicos inducen una respuesta biológica positiva en el huésped, donde favorecen al sellado y evita la comunicación entre tejidos peri-radicales con el interior del diente. (Trujillo-hernández, Flores-ventura, & Msc, 2019) Las infecciones crónicas recurrentes en los conductos radiculares tienen como principal etiología la persistencia de microorganismos en el sistema de conductos o los tejidos peri-radicales, causando una inflamación crónica de estos, llegando a causar signos y síntomas molestos para los pacientes. El tratamiento de elección es la cirugía apical después de haberse realizado la reintervención endodóntica, una vez realizada la cirugía y resección apical esta porción radicular expuesta remanente debe de ser sellada para el éxito del tratamiento, los materiales biocerámicos son la principal opción ya que se ha visto una respuesta biológica y antimicrobiana, el éxito de estos materiales a 5 años se ha reportado que es de 86.4-95.6 % .(Abusrewil et al., 2018; Bhavana et al., 2015)

Los materiales biocerámicos al tener características reparativas y de inducción celular, y al estar en íntima relación con los tejidos se han estudiado para ver su comportamiento al estar en contacto con distintas sustancias y ambientes los cuales podrían cambiar sus características mecánicas, químicas y bioactivas. *Agraffioti et al.* Realizaron un estudio en el cual el objetivo consistía en



evaluar la microestructura adquirida después de exponer MTA Y Biodentine a distintas soluciones: solución salina y ácido cítrico con un pH 5.4 por tres meses y observar si afectaba en el sellado. Lo que resultó fue que si hubo modificaciones en la microestructura en ambos materiales, pero siendo el MTA el que presentó menos cambios en ambientes ácidos, pero sin tener una diferencia significativa. *Trujillo et al*, también evaluarón el cambio estructural y la producción de apatitas al estar en contacto con PBS que es una solución salina amortiguada por fosfato, la cual encontraron cambios morfológicos y precipitación del material, donde conformaba distintas estructuras morfológicas en la superficie de los materiales. En nuestra investigación no evaluamos como tal la estructura de las superficies de los materiales, pero al observar los controles podemos ver que si hay modificación en la estructura de los materiales al estar en contacto con un medio de cultivo de BHI (Infusión cerebro-corazón), creando precipitados, con protuberancias del mismo material, desprendimiento de este y observando porosidades y rugosidades sobre la superficie en distintos patrones. Estas superficies con desniveles y rugosidades sirven como nichos para la precipitación de los microorganismos y facilitan la formación de un biofilm. (Agrafioti et al., 2016; Trujillo-hernández et al., 2019)

En el sistema radicular se ha visto que las bacterias sufren de una privación de nutrientes la cual ayuda a activar una respuesta adaptativa eficiente, causando reacciones reguladoras para cambiar su equilibrio metabólico de la biosíntesis y la reproducción, adquiriendo energía metabólica propia para la función biológica existente, así creando un estado latente, en el cual estas pueden seguir vivas, sin estar en función reproductiva, este fenómeno se ha observado en estudios en donde de un 100% de las bacterias que se someten a este proceso el 75%-80% se mantienen en este estado, llamado viable no cultivable. *Shen et al* realizaron un estudio en donde colocaron a bacterias anaerobias bajo estrés alimenticio y vieron el crecimiento de biofilm, donde vieron que estas podían crecer hasta 30-100 micrómetros de ancho en biofilm. Nuestro estudio concuerda, ya que a pesar que el grosor no se sabe con exactitud, nosotros podemos ver que la superficie del material y la dentina están repletas del microorganismo, y que si hacemos un acercamiento a las grietas o superficies más profundas podemos observar como la típica forma cocoide se observa incrustada sobre estas superficies, al igual que se observan superficies "lisas" en donde podemos llegar a observar, y deducir que es la típica forma pediculada con una altura vertical, la cual se le dice que tiene aspecto de "champiñón" conformada por multicapas de millones de cocos, formando una biopelícula/biofilm maduro. (Shen, Stojicic, & Haapasalo, 2010)

*Bhavana et al.*, realizaron un estudio en el cual se colocaron diferentes materiales como es el Biodentine, MTA y Ionómero de vidrio en contacto con distintos microorganismos tanto bacterias (*S. mutans*, *E. faecalis*, *E. coli*) como hongos (*Candida*), en donde se pudo observar que el Biodentine tuvo valores superiores que el MTA y Ionómero de vidrio, pero sin tener diferencia significativa con el MTA. Biodentine y MTA lograron tener una respuesta favorables contra el *E. faecalis*. (Bhavana et al., 2015) Mientras que *Estrela et al* y *Kim et al* tuvieron diferentes resultados donde el MTA no observaron actividad antimicrobiana contra el *E. faecalis*, al igual que en este estudio, donde toda la superficies tanto de la interfaz de la dentina del material como en la superficie del material se encontró biofilm de ambos MTA, gris y blanco. (Ch’ng et al., 2019; Estrela et al., 2018)(Artigo - Carlos Estrela – 2000)

La principal diferencia entre MTA gris y blanco es la disminución o ausencia de óxido de hierro que forma una fase tetracalciumalumino-ferrita. Como se ha mencionado antes, las manipulación del material, en cuanto a proporciones líquido-polvo, tiempos de mezclado, tiempo en solidificación, etc. Puede que altere las propiedades físicas y químicas de estos, así que *Khalid AL-Hezaimi et al.* en su estudio compararon las diferentes proporciones de ambos MTA para la eliminación o disminución de microorganismos, donde se observó que para *E. faecalis* concentraciones de 50, 25 y 12,5 mg / ml en MTA gris no se mostró crecimiento bacteriano en ninguno de los períodos de tiempo probados (24, 48 y 72 horas); pero MTA blanco se encontró crecimiento bacteriano en todas las concentraciones y períodos de tiempo evaluados. En nuestro estudio se utilizaron la proporción polvo liquido indicada por la compañía, y a pesar de la concentración utilizada ambas superficies MTA Blanco y MTA Gris se encuentran con formación de biofilm.(Al-Hezaimi, Al-Shalan, et al., 2006; Kaur et al., 2017)

Biodentine es un material a base de silicatos que se introdujo en 2010 como un sustituto de la dentina, ya que presenta propiedades mecánicas similares a esta. Al igual que el MTA, este presenta biocompatibilidad y características de inducción celular, se le han estudiado sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas las cuales han tenido buena respuesta, estas propiedades se le atribuyen a la capacidad de liberación de iones de calcio potencializando su capacidad de crear ambientes alcalinos. *Hiremath et al* realizaron un estudio en el cual evaluaron y comprobaron la eficacia antimicrobiana de Biodentine contra MTA, en el cual no se observaron diferencias significativas antifúngicas(*Candida*), pero contra *E. faecalis*, Biodentine tuvo una mejor respuesta inhibitoria en distintos tiempos que el MTA. *Bhavana et al* también evaluó la respuesta inhibitoria

de distintos materiales con distintos microorganismos, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, y *Candida albicans*, en el cual llego a la conclusión que Biodentine tuvo la mejor respuesta inhibitoria antes estos microorganismos a comparación de materiales como el MTA y lónomero de Vidrio, aclarando que no los eliminaba si no que simplemente los inhibía. (Bhavana et al., 2015) (Hiremath et al., 2015) (Abusrewil et al., 2018)

En nuestro estudio los tres materiales presentaron presencia de microorganismos sobre su superficies, en el cual podemos encontrar las diferentes etapas de la formación biofilm el cual consta de 1) adherencia de los microorganismos a las superficies, 2) microcolonización o formación de colonias, 3) maduración de biofilm, y 4) crecimiento, dispersión y desprendimiento de los microorganismos. A pesar de las distintas etapas encontradas, se pueden ver diferentes patrones de crecimiento, en la cual se pueden ver en todos estos las formas típicas de enterococos, que son de forma redondeada con un mínimo alargamiento, dando forma cocoide, donde concuerda con la investigación de Santos et al, su caracterización comienza con el recubrimiento de las zonas con el microorganismos, donde las superficies evaluadas se encuentran repletas de estructuras cocoides, pudiendo estar de manera individual, cadena o racimos, pasando a una etapa donde se observa redes de polimeros extracelular formando microcolonias, y por ultimo llegando a formar patrones que tienen superficies mas lisas pero con estructuras cocoides todavía visibles, todo esto se observó en distintos periodos de tiempo 24h, 36h, 72h, 192 y 360 h, a pesar que nosotros vimos todos estos patrones despues de 21 días, concuerda con la descripción de su investigación, confirmando la presencia de biofilm sobre la superficies de los distintos materiales de obturación utilizados. (Santos et al., 2008)

*George et al.* realizó un estudio en donde evaluan la formación de biofilm de *E. faecalis* con dos condiciones ambientales diferentes, una con medio de cultivo nutrido y la otra en estrés alimenticio a 21 días, la cual en nuestro utilizamos la ultima mencionada. En la descripción de esta formación menciona que las estructuras maduras formadas por un estrés alimenticio son mas dispersas que en un ambiente nutrido, ya que no se encuentra una forma tan marcada de "champiñon", la cual consta de un abultamiento o conglomeración de aspecto liso y solido de microorganismos en donde se pueden encontrar canales para su nutrición, en su estudio encuentran un biofilm "maduro" solo se ve como agrupaciones de bacterias, lo cual en nuestro estudio encontramos las dos estructuras de biofilm maduro mencionados, de "champiñon" y de agrupaciones bacterianas, ya que fue el mismo tiempo de ambos estudios. Al igual que concuerda con que el hecho de

mantener a un microorganismo en estrés alimenticio no afecta en el crecimiento y formación de biofilm.(George, Kishen, & Song, 2005)

## **Conclusiones**

Los materiales biocerámicos a pesar de las propiedades antimicrobianas que se le atribuyen, tienen características que ayudan a la formación de biofilm. Ya que presentan superficies asimétricas y con rugosidades que hacen que el asentamiento y adhesión a esta sea favorable para su reproducción. Las lecturas en el Microscopio electrónico de barrido nos muestra como existe estructuras de morfología cocoide, que se encuentran en racimos, cadenas y aglomeraciones, rodeadas de una matriz de polímeros extracelulares las cuales nos confirman la una acción metabólica y activa del microorganismo, esto se observó en los tres materiales estudiados, MTA Gris, MTA Blanco y Biodentine, viendo en ellos todas las fases de formación de biofilm.

Por eso es importante que en cualquier tratamiento que tenga una infección persistente o existencia de microorganismos patógenos, se realice una protocolo de limpieza y desinfección, ya que es lo que nos va a garantizar el éxito de nuestros tratamientos; hoy en día los microorganismos han evolucionado y creado mecanismos de adaptación los cuales ayudan a su supervivencia y desarrollo.

## **Perspectivas**

El presente trabajo deja las siguientes perspectivas:

- Aumentar el número de muestras
- Extender tiempos de evaluación
- Conteo de UFC
- Formación de Biofilm polimicrobiano sobre la superficies de los materiales.
- Realizar lecturas en microscopio de fuerzas atómicas

## Bibliografía

- About, I. (2016). Biodentine: dalle proprietà biochimiche e bioattive alle applicazioni cliniche. *Giornale Italiano Di Endodonzia*, 30(2), 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.gien.2016.09.002>
- Abusrewil, S. M., McLean, W., & Scott, J. A. (2018). The use of Bioceramics as root-end filling materials in periradicular surgery: A literature review. *Saudi Dental Journal*, 30(4), 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2018.07.004>
- Agrafioti, A., Tzimpoulas, N., Chatzitheodoridis, E., & Kontakiotis, E. G. (2016). Comparative evaluation of sealing ability and microstructure of MTA and Biodentine after exposure to different environments. *Clinical Oral Investigations*, 20(7). <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1638-6>
- Al-Hezaimi, K., Al-Shalan, T. A., Naghshbandi, J., Oglesby, S., Simon, J. H. S., & Rotstein, I. (2006). Antibacterial Effect of Two Mineral Trioxide Aggregate (MTA) Preparations Against *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus sanguis* In Vitro. *Journal of Endodontics*, 32(11), 1053–1056. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.06.004>
- Al-Hezaimi, K., Naghshbandi, J., Oglesby, S., Simon, J. H. S., & Rotstein, I. (2006). Comparison of antifungal activity of white-colored and gray-colored mineral trioxide aggregate (MTA) at similar concentrations against *Candida albicans*. *Journal of Endodontics*, 32(4), 365–367. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.08.014>
- Al-Sabek, F., Shostad, S., & Kirkwood, K. L. (2005). Preferential attachment of human gingival fibroblasts to the resin ionomer geristore. *Journal of Endodontics*, 31(3), 205–208. <https://doi.org/10.1097/01.don.0000137650.61607.25>
- Aliuddin, S. K., Prakash, P., Mohiuddin, S., Ravula, S. R., Nallamilli, L. V., & Dutt, A. D. (2017). Historical Milestones in Endodontics: Review of Literature. *International Journal of Preventive and Clinical Dental Research*, 4(1), 56–58. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10052-0081>
- Allen, R. K., Newton, C. W., & Brown, C. E. (1989). CLINICAL ARTICLEA Statistical Analysis of Surgical and Nonsurgical Endodontic Retreatment Cases. *Journal of Endodontics*, 261–266. Retrieved from [papers3://publication/uuid/C88483DA-C405-4F26-A5A8-663B7BD7EED3](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33000000/)
- Beltran-Leal, A., Muñoz-Ruiz, A., Esparza-Villalpando, V., Castro, Y., Pozos-Guillen, A., & Flores, H. (2020). 5-Aminolevulinic Acid Photoactivated Over Planktonic and Biofilm Forms of *Enterococcus Faecalis* As a Pharmacological Therapy Alternative. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56, 1–9. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000318544>
- Bhavana, V., Chaitanya, K. P., Gandi, P., Patil, J., Dola, B., & Reddy, R. B. (2015). Evaluation of antibacterial and antifungal activity of new calcium-based cement (Biodentine) compared to MTA and glass ionomer cement. *Journal of Conservative Dentistry*, 18(1), 44–46. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.148892>
- Borges, A. H., Pedro, F. L. M., Semanoff-Segundo, A., Miranda, C. E. S., Pécora, J. D., & Cruz Filho, A.

- M. (2011). Radiopacity evaluation of Portland and MTA-based cements by digital radiographic system. *Journal of Applied Oral Science*, 19(3), 228–232. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572011000300009>
- Cerra, H., Aversa, N., Carbone, N., Carnevali, S., Chiesa, C., Covo, M., ... Zaresky, A. (2013). *Manual de Microbiología aplicada a las Industrias Farmacéutica, Cosmética y de Productos Médicos*.
- Ch'ng, J. H., Chong, K. K. L., Lam, L. N., Wong, J. J., & Kline, K. A. (2019). Biofilm-associated infection by enterococci. *Nature Reviews Microbiology*, 17(2), 82–94. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0107-z>
- Chen, L., Li, X., Zhou, X., Zeng, J., Ren, Z., Lei, L., ... Li, Y. (2018). Inhibition of *Enterococcus faecalis* Growth and Biofilm Formation by Molecule Targeting Cyclic di-AMP Synthetase Activity. *Journal of Endodontics*, 44(9), 1381-1388.e2. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.05.008>
- Chércoles-Ruiz, A., Sánchez-Torres, A., & Gay-Escoda, C. (2017). Endodontics, Endodontic Retreatment, and Apical Surgery Versus Tooth Extraction and Implant Placement: A Systematic Review. *Journal of Endodontics*, 43(5), 679–686. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.01.004>
- Ching, H. S., Luddin, N., Kannan, T. P., Ab Rahman, I., & Abdul Ghani, N. R. N. (2018). Modification of glass ionomer cements on their physical-mechanical and antimicrobial properties. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 30(6), 557–571. <https://doi.org/10.1111/jerd.12413>
- Coriell, L. L., & McGarrity, G. J. (1970). Evaluation of the Edgegard laminar flow hood. *Applied Microbiology*, 20(3), 474–479. <https://doi.org/10.1128/aem.20.3.474-479.1970>
- Dahlén, G., Samuelsson, W., Molander, A., & Reit, C. (2000). Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiology and Immunology*, 15(5), 309–312. <https://doi.org/10.1034/j.1399-302X.2000.150507.x>
- Dahlkemper, P. E., Ang, D. B., Goldberg, R. A., Rubin, R. L., Schultz, G. B., Sheridan, B. A., ... Powell, W. D. (2013). Guide to Clinical Endodontics, Sixth Edition. *American Association of Endodontics*, 1–40. Retrieved from <https://www.aae.org/specialty/clinical-resources/guide-clinical-endodontics/>
- de Paz, L. C. (2007). Redefining the Persistent Infection in Root Canals: Possible Role of Biofilm Communities. *Journal of Endodontics*, 33(6), 652–662. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.11.004>
- de Vasconcelos, B. C., Bernardes, R. A., Cruz, S. M. L., Duarte, M. A. H., de Magalhães Padilha, P., Bernardineli, N., ... de Moraes, I. G. (2009). Evaluation of pH and calcium ion release of new root-end filling materials. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 108(1), 135–139. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.02.026>
- Del Fabbro, M., Corbella, S., Sequeira, P., Tsesis, I., Rosen, E., Lolato, A., & Taschieri, S. (2016). Endodontic procedures for retreatment of periapical lesions ( Review ) SUMMARY OF



- FINDINGS FOR THE MAIN COMPARISON. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 10(10), CD005511–CD005511. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005511.pub3.www.cochranelibrary.com>
- Duarte, M. A. H., Marciano, M. A., Vivan, R. R., Tanomaru-Filho, M., Guerreiro-Tanomaru, J. M., & Camilleri, J. (2018). Tricalcium silicate-based cements: properties and modifications, *32*, 111–118. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0070>
- Eraković, M., Duka, M., Bekić, M., Tomić, S., Ismaili, B., Vučević, D., & Čolić, M. (2020). Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of Biodentine on human periapical lesion cells in culture. *International Endodontic Journal*, 53(10), 1398–1412. <https://doi.org/10.1111/iej.13351>
- Espinoza, F., & Lizana, A. (2020). Biocerámicos en Odontología , Una revisión de literatura. *Canal Abierto*, 41, 14–21.
- Estrela, C., Decurcio, D. de A., Rossi-Fedele, G., Silva, J. A., Guedes, O. A., & Borges, Á. H. (2018). Root perforations: A review of diagnosis, prognosis and materials. *Brazilian Oral Research*, 32, 133–146. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0073>
- Fischer, E. R., Hansen, B. T., Nair, V., Hoyt, F. H., & Dorward, D. W. (2012). *Scanning electron microscopy. Current Protocols in Microbiology*. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc02b02s25>
- George, S., Kishen, A., & Song, K. P. (2005). The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*, 31(12), 867–872. <https://doi.org/10.1097/01.don.0000164855.98346.fc>
- Grech, L., Mallia, B., & Camilleri, J. (2013). Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dental Materials*, 29(2), e20–e28. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.11.007>
- Guerreiro-Tanomaru, J. M., Trindade-Junior, A., Cesar Costa, B., Da Silva, G. F., Drullis Cifali, L., Basso Bernardi, M. I., & Tanomaru-Filho, M. (2014). Effect of Zirconium Oxide and Zinc Oxide Nanoparticles on Physicochemical Properties and Antibiofilm Activity of a Calcium Silicate-Based Material. *Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/975213>
- Guneser, M. B., Akbulut, M. B., & Eldeniz, A. U. (2013). Effect of various endodontic irrigants on the push-out bond strength of biodentine and conventional root perforation repair materials. *Journal of Endodontics*, 39(3), 380–384. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.11.033>
- Hargreaves KM, C. S. (2011). *Cohen's Pahway of the Pulp*.
- Hayes, T. L., & Pease, R. F. (1968). *The scanning electron microscope: principles and applications in biology and medicine. Advances in biological and medical physics* (Vol. 12). ACADEMIC PRESS, INC. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4831-9928-3.50006-0>

- Hiremath, G. S., Kulkarni, R. D., & Naik, B. D. (2015). Evaluation of minimal inhibitory concentration of two new materials using tube dilution method: An in vitro study. *Journal of Conservative Dentistry*, *18*(2), 159–162. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.153056>
- Idon, P. I., Sotunde, O. A., & Ogundare, T. O. (2020). Beyond the Relief of Pain: Dentin Hypersensitivity and Oral Health-Related Quality of Life. *Frontiers in Dentistry*. <https://doi.org/10.18502/fid.v16i5.2272>
- Islam, I., Kheng Chng, H., & Jin Yap, A. U. (2006). Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement. *Journal of Endodontics*, *32*(3), 193–197. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.043>
- Kaur, M., Singh, H., Dhillon, J. S., Batra, M., & Saini, M. (2017). MTA versus biodentine: Review of literature with a comparative analysis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, *11*(8), ZG01–ZG05. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/25840.10374>
- Kayaoglu, G., & Ørstavik, D. (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to endodontic disease. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, *15*(5), 308–320. <https://doi.org/10.1177/154411130401500506>
- Khan, A. S., & Syed, M. R. (2019). A review of bioceramics-based dental restorative materials. *Dental Materials Journal*, *38*(2), 163–176. <https://doi.org/10.4012/dmj.2018-039>
- Kim, S., & Kratchman, S. (2006). Modern Endodontic Surgery Concepts and Practice: A Review. *Journal of Endodontics*, *32*(7), 601–623. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.12.010>
- Kohli, M. R., Berenji, H., Setzer, F. C., Lee, S. M., & Karabucak, B. (2018). Outcome of Endodontic Surgery: A Meta-analysis of the Literature—Part 3: Comparison of Endodontic Microsurgical Techniques with 2 Different Root-end Filling Materials. *Journal of Endodontics*, *44*(6). <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.02.021>
- Leonardo, M. R., Rossi, M. A., Silva, L. A. B., Ito, I. Y., & Bonifácio, K. C. (2002). EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. *Journal of Endodontics*, *28*(12), 815–818. <https://doi.org/10.1097/00004770-200212000-00006>
- Levin, L. G., Law, A. S., Holland, G. R., Abbott, P. V., & Roda, R. S. (2009). Identify and Define All Diagnostic Terms for Pulpal Health and Disease States. *Journal of Endodontics*, *35*(12), 1645–1657. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.032>
- Ma, X., Li, C., Jia, L., Wang, Y., Liu, W., Zhou, X., ... Huang, D. (2016). Materials for retrograde filling in root canal therapy ( Review ) SUMMARY OF FINDINGS FOR THE MAIN COMPARISON. *The Cochrane*, (12). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005517.pub2.www.cochranelibrary.com>
- Manterola, C., Quiroz, G., Salazar, P., & García, N. (2019). Metodología de los tipos y diseños de

- estudio más frecuentemente utilizados en investigación clínica. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 30(1), 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2018.11.005>
- Maurício, R., Dias, C. J., Jubilado, N., & Santana, F. (2013). Biofilm thickness measurement using an ultrasound method in a liquid phase. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(10), 8125–8133. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3160-0>
- Morotomi, T., Washio, A., & Kitamura, C. (2019). Current and future options for dental pulp therapy. *Japanese Dental Science Review*, 55(1), 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2018.09.001>
- Mozini, A. C. A., Vansan, L. P., Neto, M. D. S., & Pietro, R. (2009). Influence of the length of remaining root canal filling and post space preparation on the coronal leakage of enterococcus faecalis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1), 174–179. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000100030>
- Newton, C. W., Hoen, M. M., Goodis, H. E., Johnson, B. R., & McClanahan, S. B. (2009). Identify and Determine the Metrics, Hierarchy, and Predictive Value of All the Parameters and/or Methods Used During Endodontic Diagnosis. *Journal of Endodontics*, 35(12), 1635–1644. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.033>
- Nguyen, J. N. T., & Harbison, A. M. (2017). Scanning electron microscopy sample preparation and imaging. *Methods in Molecular Biology*, 1606, 71–84. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6990-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6990-6_5)
- Oynick, J., & Oynick, T. (1978). A study of a new material for retrograde fillings. *Journal of Endodontics*, 4(7), 203–206. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(78\)80183-6](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(78)80183-6)
- Pannkuk, T. F. (2011). A new technique for nonsurgical retreatment of teeth with amalgam root end fillings: Case series. *Journal of Endodontics*, 37(3), 414–419. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.11.023>
- Parirokh, M., & Torabinejad, M. (2010a). Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review-Part I: Chemical, Physical, and Antibacterial Properties. *Journal of Endodontics*, 36(1), 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.006>
- Parirokh, M., & Torabinejad, M. (2010b). Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review-Part I: Chemical, Physical, and Antibacterial Properties. *Journal of Endodontics*, 36(1), 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.006>
- Parirokh, M., & Torabinejad, M. (2010c). Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review-Part III: Clinical Applications, Drawbacks, and Mechanism of Action. *Journal of Endodontics*, 36(3), 400–413. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.009>
- Pérez, C. M. R. (2016). Cultivo y crecimiento de los microorganismos, (December 2015), 45–54.
- Provenzano, J. C., Antunes, H. S., Alves, F. R. F., Rôças, I. N., Alves, W. S., Silva, M. R. S., & Siqueira, J. F. (2016). Host-Bacterial Interactions in Post-treatment Apical Periodontitis: A

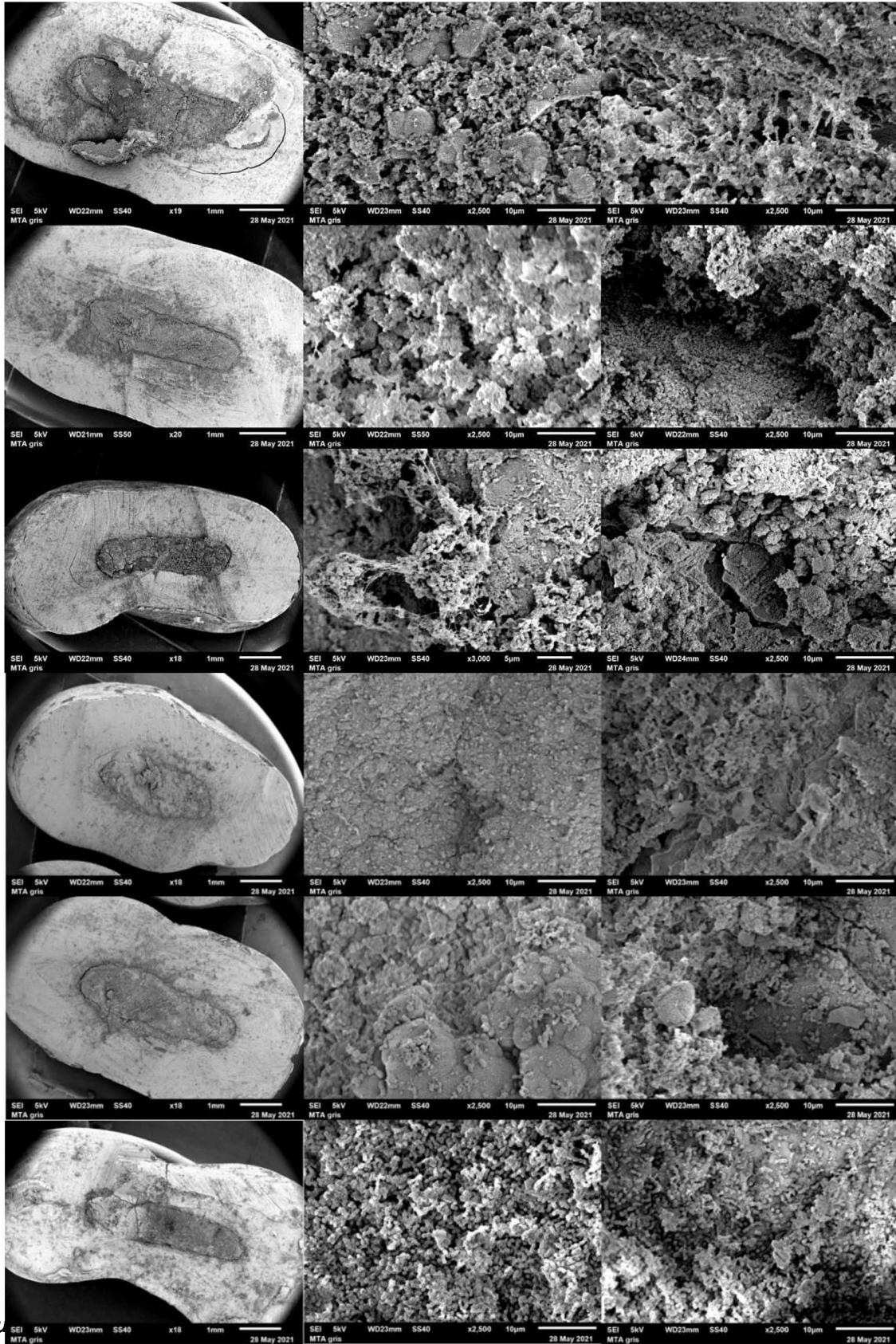
- Metaproteome Analysis. *Journal of Endodontics*, 42(6), 880–885. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.02.013>
- Rajasekharan, S., Martens, L. C., Cauwels, R. G. E. C., & Verbeeck, R. M. H. (2014). Biodentine™ material characteristics and clinical applications: A review of the literature. *European Archives of Paediatric Dentistry*, 15(3), 147–158. <https://doi.org/10.1007/s40368-014-0114-3>
- Santos, R. P., Arruda, T. T. P., Carvalho, C. B. M., Carneiro, V. A., Braga, L. Q. V., Teixeira, E. H., ... Freire, V. N. (2008). Correlation between enterococcus faecalis biofilms development stage and quantitative surface roughness using atomic force microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, 14(2), 150–158. <https://doi.org/10.1017/S1431927608080227>
- Saxena, P., Gupta, S. K., & Newaskar, V. (2013). Biocompatibility of root-end filling materials: recent update. *Restorative Dentistry & Endodontics*, 38(3), 119. <https://doi.org/10.5395/rde.2013.38.3.119>
- Seltzer, S., Bender, I. B., & Ziontz, M. (1963). The dynamics of pulp inflammation: Correlations between diagnostic data and actual histologic findings in the pulp. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 16(7), 846–871. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(63\)90323-2](https://doi.org/10.1016/0030-4220(63)90323-2)
- Sharifi, R., Araghid, A., Ghanem, S., & Fatahi, A. (2015). Effect of temperature on the setting time of Mineral Trioxide Aggregate (MTA). *Journal of Medicine and Life*, 8(Spec Iss 2), 88–91.
- Shen, Y., Stojicic, S., & Haapasalo, M. (2010). Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: Comparison of viability staining and direct culture. *Journal of Endodontics*, 36(11), 1820–1823. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.08.029>
- Signoretti, F. G. C., Endo, M. S., Gomes, B. P. F. A., Montagner, F., Tosello, F. B., & Jacinto, R. C. (2011). Persistent extraradicular infection in root-filled asymptomatic human tooth: Scanning electron microscopic analysis and microbial investigation after apical microsurgery. *Journal of Endodontics*, 37(12), 1696–1700. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.09.018>
- Sk, V., & Br, G. (2003). Root and Filling Material, 15.
- Song, M., Kim, S. G., Lee, S. J., Kim, B., & Kim, E. (2013). Prognostic factors of clinical outcomes in endodontic microsurgery: A prospective study. *Journal of Endodontics*, 39(12), 1491–1497. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.08.026>
- Souto, R., & Colombo, A. P. V. (2008). Prevalence of Enterococcus faecalis in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Archives of Oral Biology*, 53(2), 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.08.004>
- Stuart, C. H., Schwartz, S. A., Beeson, T. J., & Owatz, C. B. (2006). Enterococcus faecalis: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of Endodontics*, 32(2), 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.049>
- Su, L., Gao, Y., Yu, C., Wang, H., & Yu, Q. (2010). Surgical endodontic treatment of refractory

- periapical periodontitis with extraradicular biofilm. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 110(1), e40–e44. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.12.051>
- Subramanyam, D., & Vasantharajan, M. (2017). Effect of oral tissue fluids on compressive strength of MTA and biodentine: An in vitro study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11(4), ZC94–ZC96. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/24510.9722>
- Tamagnini, L. M., & Paraje, M. G. (2015). ¿ Qué son las bacterias viables no cultivables ? *Revista FCEFyN*, 2(2), 2013–2016.
- Tawil, Peter Z, Duggan, D. J., & Galicia, J. C. (2016). MTA: A clinical review. *Compend Contin Educ Dent*, 36(4), 247–264.
- Tawil, Peter Zahi, Trope, M., Curran, A. E., Caplan, D. J., Kirakozova, A., Duggan, D. J., & Teixeira, F. B. (2009). Periapical Microsurgery: An In Vivo Evaluation of Endodontic Root-End Filling Materials. *Journal of Endodontics*, 35(3), 357–362. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.12.001>
- Tolker-nielsen, T. I. M. (2015). Bio film Development, 1–12. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec>
- Torabinejad, M., Watson, T. F., & Pitt Ford, T. R. (1993). Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *Journal of Endodontics*, 19(12), 591–595. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)80271-2](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)80271-2)
- Torabinejad, Mahmoud, Higa, R. K., McKendry, D. J., & Pitt Ford, T. R. (1994). Dye leakage of four root end filling materials: Effects of blood contamination. *Journal of Endodontics*, 20(4), 159–163. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)80326-2](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)80326-2)
- Torabinejad, Mahmoud, Hong, C. U., McDonald, F., & Ford, T. R. P. (1995). Physical and Chemical Properties of a New Root-End Filling Material. *Journal of Endodontics*, 21(7), 349–353.
- Torres, F. F. E., Guerreiro-Tanomaru, J. M., Bosso-Martelo, R., Chavez-Andrade, G. M., & Tanomaru Filho, M. (2018). Solubility, porosity and fluid uptake of calcium silicate-based cements. *Journal of Applied Oral Science : Revista FOB*, 26, e20170465. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2017-0465>
- Trope, M., Lost, C., Schmitz, H. J., & Friedman, S. (1996). Healing of apical periodontitis in dogs after apicoectomy and retrofilling with various filling materials. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 81(2), 221–228. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(96\)80419-7](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(96)80419-7)
- Trujillo-hernández, M., Flores-ventura, R. E., & Msc, A. S. (2019). Estudio comparativo de la bioactividad de dos materiales biocerámicos Comparative Study of the Bioactivity of Two Bioceramic Materials. *ODOVTOS-International Journal of Dental Sciences*, 2(21), 73–81.
- Tsesis, I., Elbahary, S., Venezia, N. B., & Rosen, E. (2017). Bacterial colonization in the apical part of extracted human teeth following root-end resection and filling: a confocal laser scanning

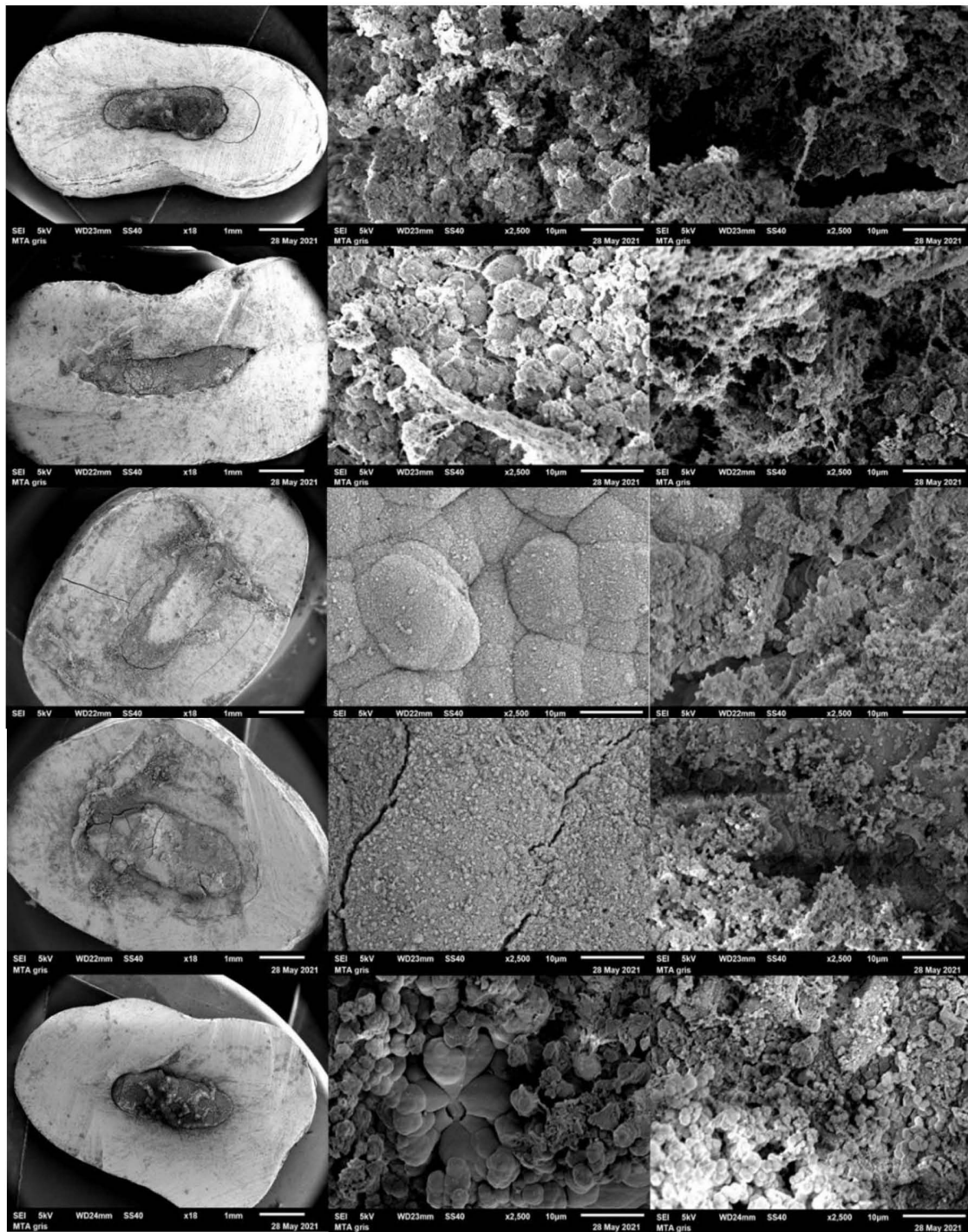
- microscopy study. *Clinical Oral Investigations*, 22(1), 267–274. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2107-1>
- Tsesis, I., Rosen, E., Taschieri, S., Telishevsky Strauss, Y., Ceresoli, V., & Del Fabbro, M. (2013). Outcomes of surgical endodontic treatment performed by a modern technique: An updated meta-analysis of the literature. *Journal of Endodontics*, 39(3), 332–339. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.11.044>
- Von Arx, T., Hänni, S., & Jensen, S. S. (2010). Clinical results with two different methods of root-end preparation and filling in apical surgery: Mineral trioxide aggregate and adhesive resin composite. *Journal of Endodontics*, 36(7), 1122–1129. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.03.040>
- von Arx, T., Jensen, S. S., Janner, S. F. M., Hänni, S., & Bornstein, M. M. (2019). A 10-year Follow-up Study of 119 Teeth Treated with Apical Surgery and Root-end Filling with Mineral Trioxide Aggregate. *Journal of Endodontics*, 45(4), 394–401. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.12.015>
- Wang, J., Jiang, Y., Chen, W., Zhu, C., & Liang, J. (2012). Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. *Journal of Endodontics*, 38(7), 954–959. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.03.004>
- Willems, H. M., Xu, Z., & Peters, B. M. (2016). Polymicrobial Biofilm Studies: from Basic Science to Biofilm Control. *Current Oral Health Reports*, 3(1), 36–44. <https://doi.org/10.1007/s40496-016-0078-y>
- Winstock, D. (1980). Apical disease: an analysis of diagnosis and management with special reference to root lesion resection and pathology. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, 62(3), 171–179.
- Yazdi, P. M., Schou, S., Jensen, S. S., Stoltze, K., Kenrad, B., & Sewerin, I. (2007). Dentine-bonded resin composite (Retroplast) for root-end filling: A prospective clinical and radiographic study with a mean follow-up period of 8 years. *International Endodontic Journal*, 40(7), 493–503. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2007.01242.x>
- Zhang, S., Wang, Q. Q., Zhang, C. F., & Soo, I. (2010). Identification of dominant pathogens in periapical lesions associated with persistent apical periodontitis. *The Chinese Journal of Dental Research*, 13(2), 115–121.

## ANEXO 1

### Grupo#1: MTA GRIS

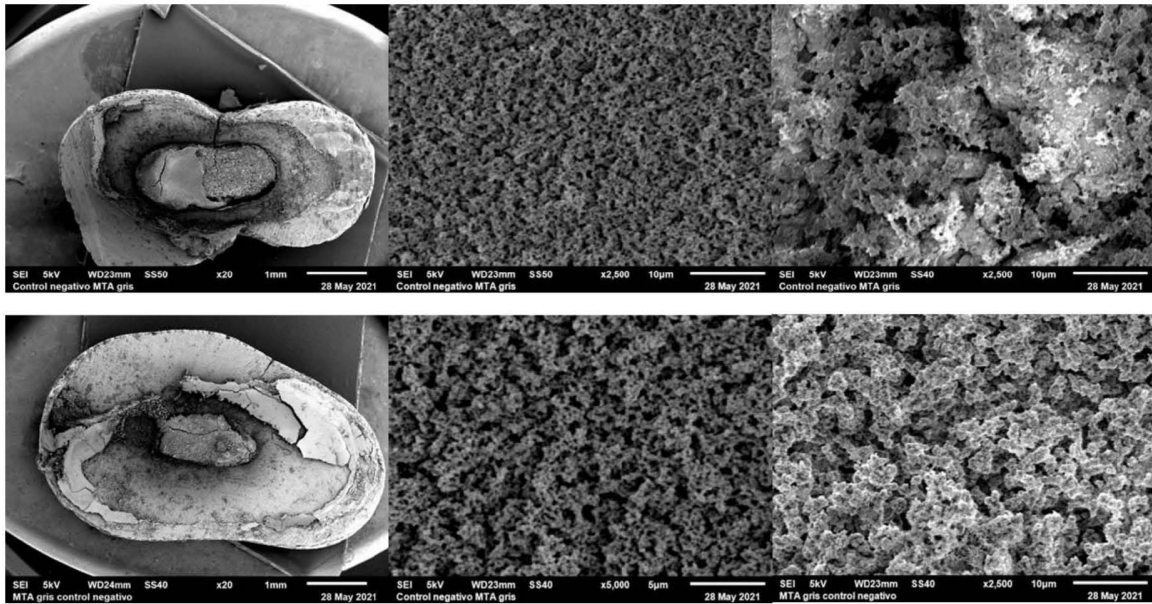


**“EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOFILM SOBRE LAS SUPERFICIES DE LOS MATERIALES BIO-CERÁMICOS, MTA Y BIODENTINE: ESTUDIO IN VITRO”**

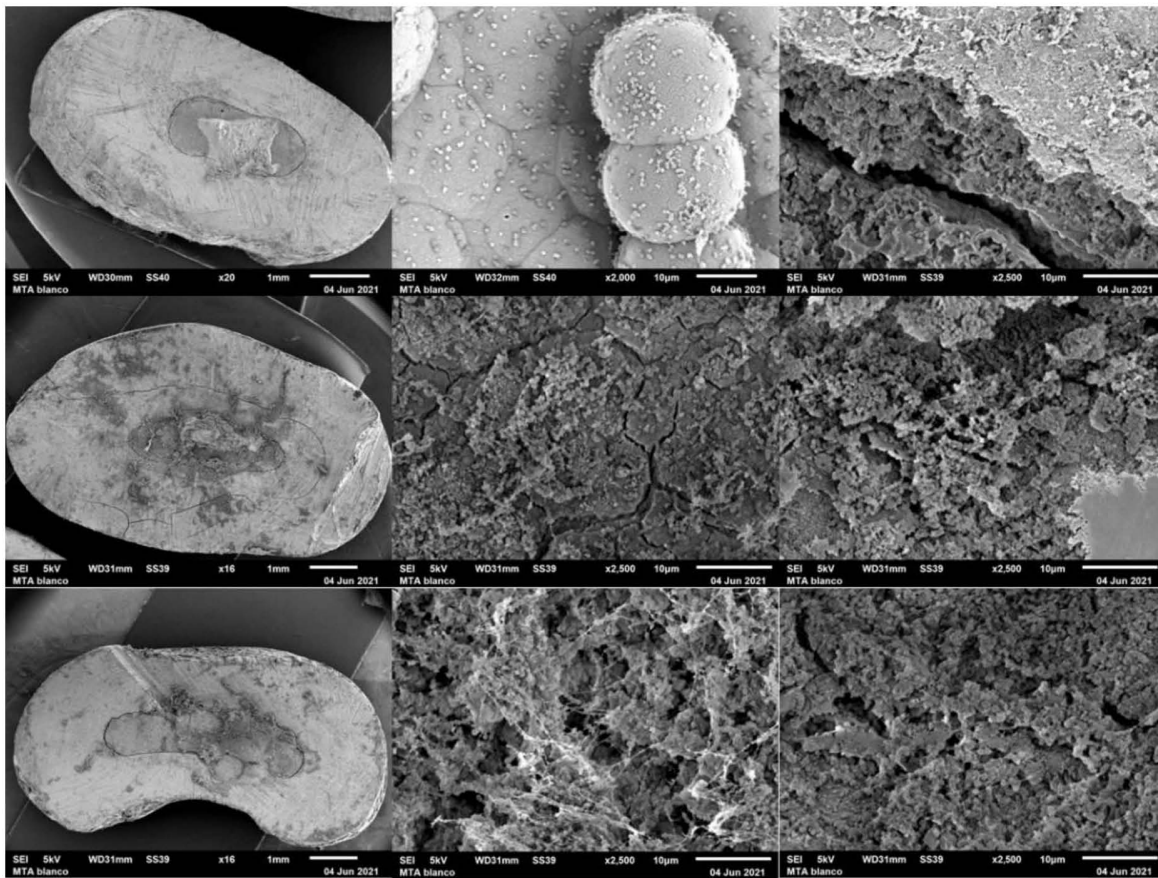




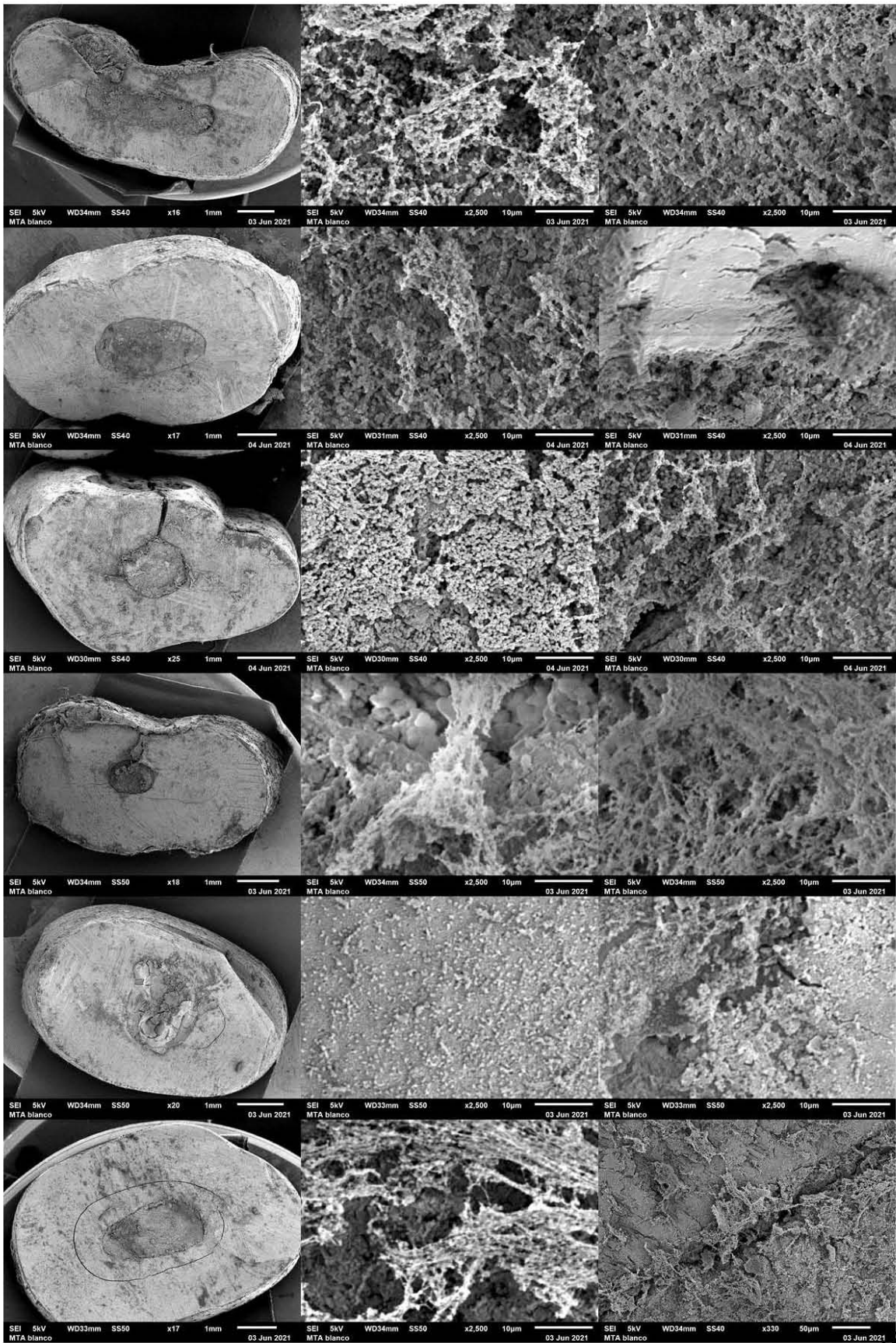
**Control Negativo MTA GRIS (MTAG)**



**Grupo #2: MTA BLANCO**

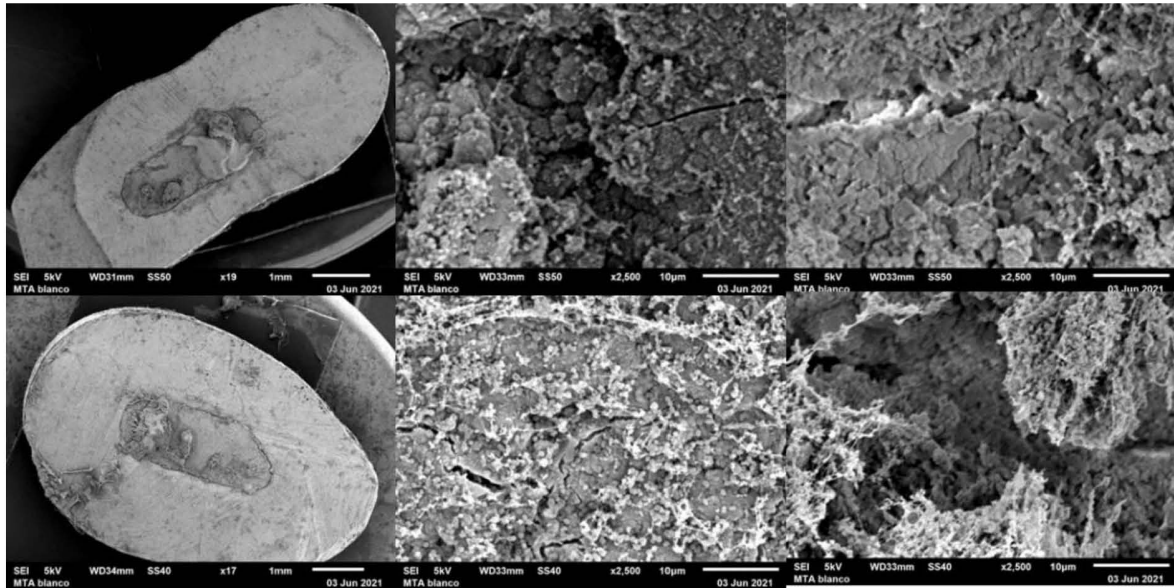


**"EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOFILM SOBRE LAS SUPERFICIES DE LOS MATERIALES BIO-CERÁMICOS, MTA Y BIODENTINE: ESTUDIO IN VITRO"**

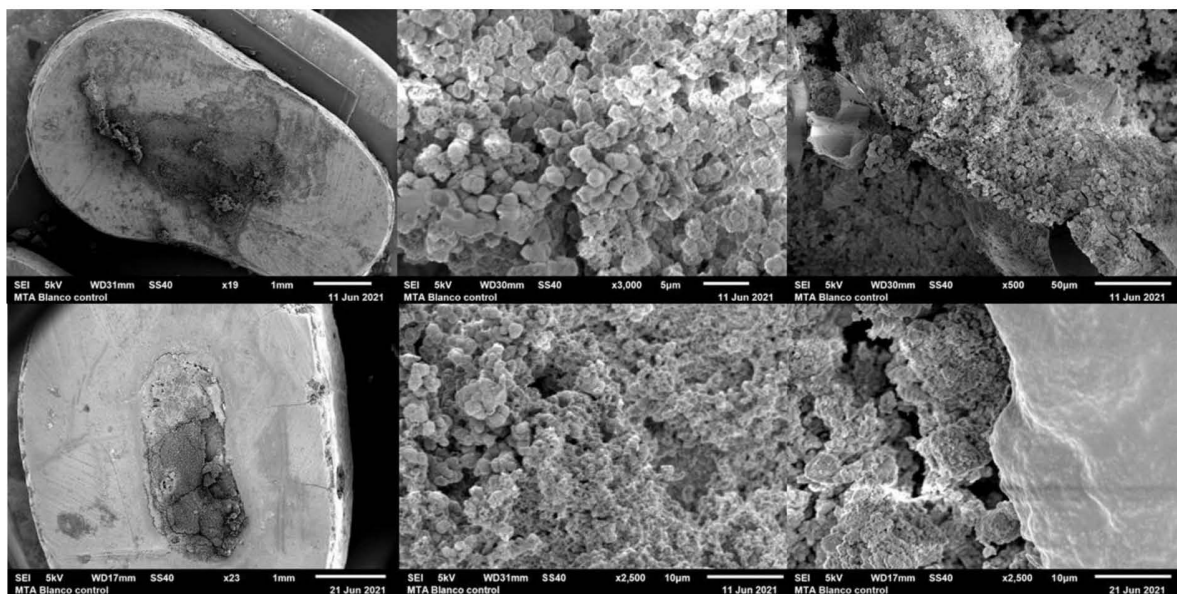


**Ruiz Flores A.**

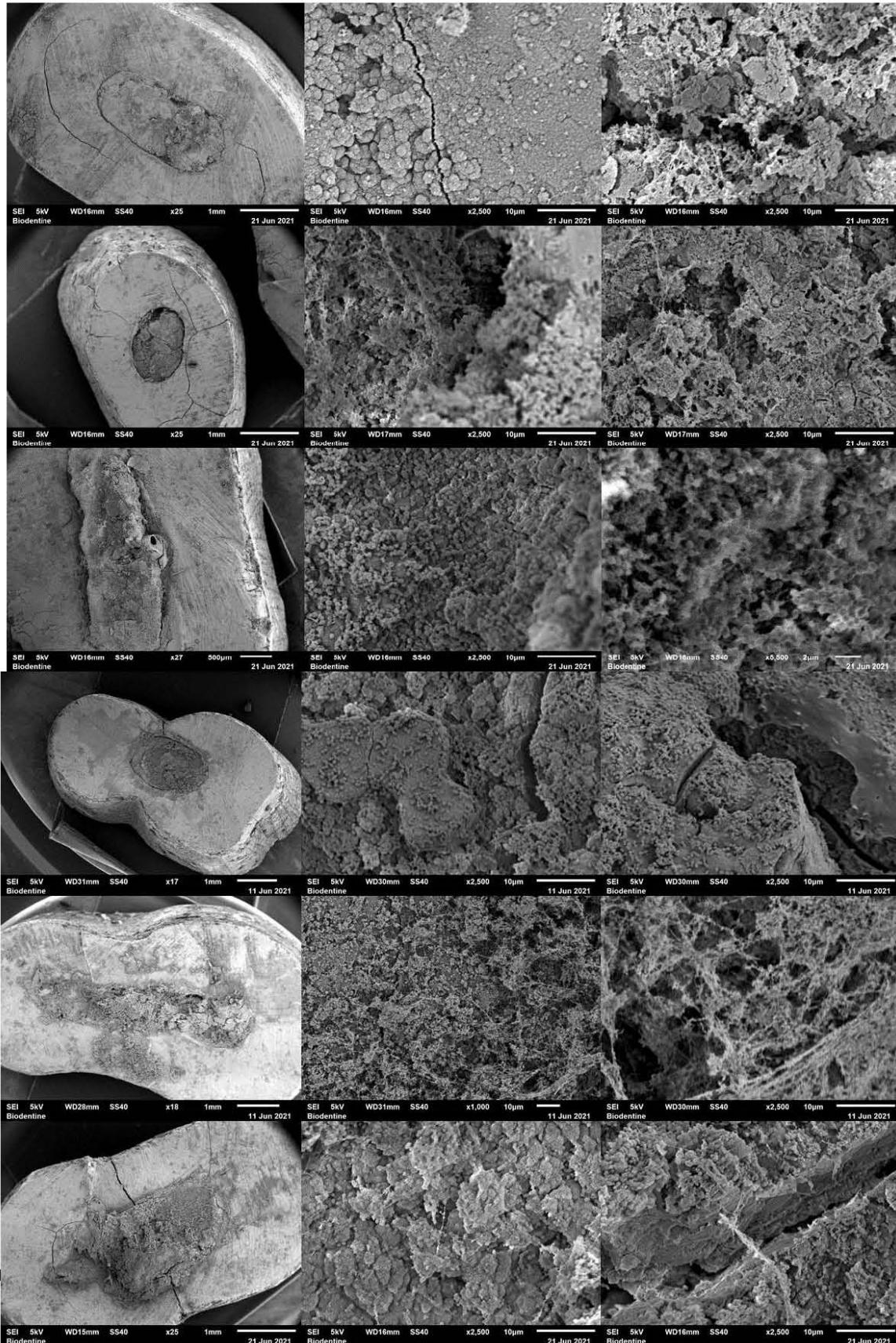
**“EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOFILM SOBRE LAS SUPERFICIES DE LOS MATERIALES BIO-CERÁMICOS, MTA Y BIODENTINE: ESTUDIO IN VITRO”**



**Control Negativo MTA BLANCO (MTAB)**

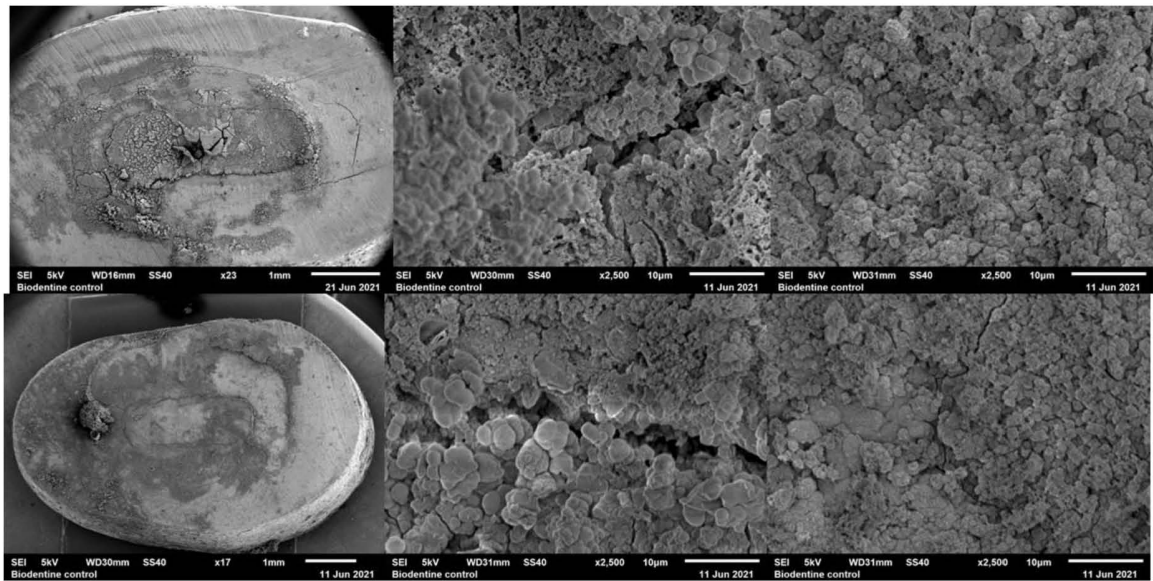


**Grupo #3 BIODENTINE**



R

**Control Negativo BIODENTINE**



**“EVALUATION OF BIOFILM FORMATION OVER MTA AND BIODETINE SURFACE AS ROOT END FILLING MATERIAL; AN INVITRO STUDY”**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**  
**FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

**“EVALUATION OF BIOFILM FORMATION OVER MTA AND BIODETINE SURFACE AS ROOT END FILLING MATERIAL; AN INVITRO STUDY”**

**C.D. Alejandra Ruiz Flores**

Thesis to opt the grade of Master in Ciencias Odontológicas Integral Avanzada

---

Maestría en Ciencias Odontológicas Integral Avanzada

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P., MÉXICO, JUNE 2021

**“EVALUATION OF BIOFILM FORMATION OVER MTA AND BIODETINE SURFACE AS ROOT END FILLING MATERIAL; AN INVITRO STUDY”**



**“EVALUATION OF BIOFILM FORMATION OVER MTA AND BIODETINE SURFACE AS ROOT END FILLING MATERIAL; AN INVITRO STUDY”**

**C.D. Alejandra Ruiz Flores**

Thesis to opt the grade of Master in Ciencias Odontológicas Integral Avanzada

---

2021, Maestría en Ciencias Odontológicas, UASLP, México.

DIRECTOR.....Francisco J. Gutiérrez Cantú, PhD

ASESOR.....Ana María González Amaro, M.C

ASESOR..... Abraham Israel Muñoz Ruiz, PhD.

ASESOR.....Rita E. Martínez Martínez , PhD

JUNE 2021

*Ruiz Flores A.*

**"EVALUATION OF BIOFILM FORMATION OVER MTA AND BIODETINE SURFACE AS ROOT END FILLING MATERIAL; AN INVITRO STUDY"**

***Dedicated to***

**My family, pillar of all my battles**

***Ruiz Flores A.***



## ***Acknowledgment***

To God for being in every step I took

To my parents, for create the person that I am today, and giving me the opportunity of a better education, I will always be in debt with you.

Dr. Abraham Muñoz for all the patient and time you took to be there for me, as a teacher and a friend.

Dra. Ana María Glz. For being the joy and the wisdom on my experimental phase, thanks por all the things you make me learn.

Selene for all the patient and knowledge in the laboratory and for all the advice in life material.

Ascana for giving me the support and patient in every step on the way and being the peace, I needed every time I break down, you have been all the way since this started.

Noe for being my home, friend, therapist, psychologist, sister and always put up on me.

My teachers for being the ones that pushes me to do better, support me, correct me and giving me the tools for a better dental practice.

**“EVALUATION OF BIOFILM FORMATION OVER MTA AND BIODENTINE SURFACE AS ROOT END FILLING MATERIAL; AN INVITRO STUDY”**

**“EVALUATION OF BIOFILM FORMATION OVER MTA AND BIODENTINE SURFACE AS ROOT  
END FILLING MATERIAL; AN INVITRO STUDY”**

**Alejandra Ruiz Flores**

Universidad Autónoma De San Luis Potosí  
Facultad De Estomatología  
Maestría En Odontología Integral Avanzada

**Objectives:** To evaluate the presence of biofilm formation of *E. faecalis* on the surface of MTA Gray, MTA White and Biodentine In Vitro

**Methods:** 37 uni-radicular premolar teeth were used, extracted for orthodontic reasons, 3 dentin discs were obtained from each root of the teeth. A preclinical phase involved the cutting, cleaning, and disinfection of the samples; as well as its obturation with the different bioceramics materials, MTA Gray (Angelus), MTA White (Angelus) and Biodentine (Septodont). In the microbiological phase, biofilm of *E. faecalis* (laminar method and food stress) was formed on the obturated dentin discs for 21 days, changing the culture medium (BHI) every 48 hours. The samples were prepared for reading in the Scanning Electron Microscope (SEM), which consisted of fixation, dehydration, drying at a critical point and coverage in a gold bath. The reading was made in different magnifications of 20x, 2500x, 5000x, on the surface of the material and its interface with the dentin.

**Results:** In the three retro-filling materials, the stages of the biofilm formation were found and observed, which confirms that despite the fact that these materials have antimicrobial properties, an infection can persist since Biofilm can grow and evolve on their surfaces.

**Conclusions:** The cleaning of any dental surface, should be the main concern of a dentist for the success of any treatment against microorganisms.

**Key words:** Biofilm, *E. faecalis*, MTA Gray, MTA White, Biodentine

## **INTRODUCTION**

Endodontics is the field of dentistry that studies the morphology, physiology and pathology of dental pulp and peri-radicular tissues, also involves the study of the biology of healthy and diseased pulp; etiology, diagnosis, prevention, treatment of the pulpal and peri-radicular tissue conditions (Morotomi, Washio, & Kitamura, 2019)(Hargreaves KM, 2011)

The science of endodontics has been in practice since 200 b. C., the oldest root canal treatment was reported in a Nabatean’s warrior skull and it was filled with a bronze wire; In the 668 a .C was found a Papyrus suggesting the “Worm Theory”, which was stating the tooth decay, for which root canal treatment with metal was done; but it was until 1728 that Pierre Fauchard introduced his book “The Surgeon Dentist” with new concepts and emergencies management of the tooth. In 1912 Fisher published the first study of the root canal anatomy. In 1943 the American Association of Endodontic was formed and not until 1963 was recognized endodontics as a dental specialty. (Aliuddin et al., 2017)

Dental pulp is a connective tissue surrounded by dentin and enamel, it has different functions: formative, protective, nutritive, and reparative activities, also provides tooth vitality, supplied via foramen by blood vessels, nerves and immune cells (lymphocytes, macrophages etc.). (Morotomi et al., 2019; Seltzer, Bender, & Ziontz, 1963a)

The pathogenesis of the lesions can be better diagnosed and understood by doing an adequate evaluation with dental anamnesis, vitality testing, periodontal probing, radiographic assessment, and prosthetics planation, these are potential factors that help us decided which treatment is going to proceed; The treatment of dental pulp disease will be determined by the pulp, peri-radicular damage, and on the objective to be met. The root canal treatment procedure consists of a chemical-mechanical technique, promoting the healing of the tissues. This treatment is indicated for asymptomatic or symptomatic pulp inflammation, necrosis, dental fractures with pulp damage, etc. The prognosis for each type of treatment varies depending on the systemic and local conditions of the patient. (Hargreaves KM, 2011)

## **THEORETICAL FRAMEWORK**

## **Therapeutics**

The main causes or factors that induce pulpal damage and diseases are inflammatory and infectious reactions like caries, microbes, tooth wear and traumatism, which can lead to irreversible pulp damage or necrosis. (Morotomi et al., 2019; Sakko, Tjäderhane, & Rautemaa-Richardson, 2016; Su, Gao, Yu, Wang, & Yu, 2010)). Diagnosis of the damage pulp can be associated with many subjective and clinical (objectives) evidence. Diagnosis is defined as “the ability of a test to discriminate between the target condition and health. This discriminative potential can be quantified by the measures of diagnostic accuracy such as sensitivity, specificity, and predictive values” (Dahlkemper et al., 2013; Simundic, 2009). To know how to identify a damage pulp, we must understand a “healthy and normal pulp” which is more related to subjective symptoms like vitality and sensibility that are “asymptomatic” or feeling the same as the other teeth in the mouth, signs are within normal response to percussion, palpation, cold, hot, or electrical stimuli no longer from a few seconds and no pain; radiographic appearance shows normal peri radicular tissues. (Levin et al., 2009) Pain is a subjective way to get an objective answer from the patient, giving us a description of the experience that their having. Most of the times pain is associated to the pulp disease. Several techniques for pain measurement have been described, including verbal rating scales, color, faces, numbers of analog scales, questionnaires, etc.; but none of these gives us a certain and official diagnose. The different conditions of the pulp that can be identified have different clinical manifestations, radiographic, subjective, and objectively, there are different methods of evaluation, like: pulp-vitality test, that consist of different ways of reproducing the pain that the patient is experiencing in the moment. (Levin, Law, Holland, Abbott, & Roda, 2009) Pulp test can give us a thermal reaction, heat or cold, palpation and percussion is that respond or none of them; some other approaches are bite test, selective anesthesia, test cavity, pain signs/symptoms, radiographic test, etc. (Idon et al., 2020; Newton, Hoen, Goodis, Johnson, & McClanahan, 2009). The differences in how the pulp react to the stimulus mentioned before is what is going to give us a presumptive diagnosis. Factors that have an important weight on it and must have in mind are, age of the patient, time, pressure, and direction of the application of stimulus, presence of systemic diseases, and the main motive of the checkup. (Levin et al., 2009; Newton et al., 2009).

Pulp damage can be classified as vital case or non-vital case, in which the first is based on a biologically approach, pain may increase with a stimulus or not, this is due to the increase of the intrapulpal pressure and the release of inflammatory mediators. In this case the challenge is in how

to treat an inflamed pulp with innervated tissue without causing pain. In the non-vital cases the process intrapulpal faces a microbiologic challenge, and this can be symptomatic or asymptomatic. This happens because of the imbalance of the host-bacteria relation, this means that bacteria increase, and the defense mechanisms are low. The goal in these cases is to reduce the bacteria in the root canal system and decompress the peri-radicular tissue if they have been affected. (Hargreaves KM, 2011)

Reversible pulpitis implies the presence of a mild inflammation resulted of caries, trauma, or defective restauration, it could have a constant mild-severe pain response, which is a symptom of dentin hypersensitivity; this situation can be stimulated by normal activities over the day such as eating sours, drinking cold, or sugary fluids, tooth brushing, getting cold air when talking, etc. Reversible pulpitis as its name says it, it can revert its symptoms if the etiology of the problem is removed. (Idon et al., 2020; Levin et al., 2009; Seltzer, Bender, & Ziontz, 1963b).

Irreversible pulpitis occurs when a degenerative process of the pulp involves inflammation and it doesn't heal, isn't reversible; if it's not treated it will lead to a necrosis of the pulp, microbiologic challenge and cause apical periodontitis or an abscess. It classifies in asymptomatic and symptomatic irreversible pulpitis. The first one is characterized by the absence of clinical pain; and symptomatic irreversible pulpitis is characterized by a mild to severe pain, which can be cause when the tooth is exposed to irritants, such as food, heat, or cold things; this pain might be sharp or dull, and the pain is prolonged beyond the irritant is removed. The pain can be described as short and sharp when the stimulus is on but varies with the perception of every patient, the pain resolves after the stimulus is removed; the capacity of the tooth for healing requires retiring the etiology of the inflammation, once it gone, the pain is gone too. The treatment of irreversible pulpitis is a canal root therapy or extraction. (Idon et al., 2020; Levin et al., 2009; Seltzer, Bender, & Ziontz, 1963b)

Pulp necrosis is the loss of vitally and blood supplies of the root, it can be cause of trauma, untreated pulpitis, bacteria invasion, etc.; because of the lack of vitally and blood supplies, cell starts to die, and it expands until all the cells in the pulp are death and this is called necrosis. The symptoms can vary, none of them have severe pain, no sensitivity to thermal or electric stimulus, occasionally it can respond to heat but it's not likely, have a bite sensitivity that cause a mild pain, it can change color because of the decomposition of the cells and the translucency of the tooth. The treatment is a root canal therapy. (Levin et al., 2009; Ma et al., 2016).

Endodontic treatment is a non-surgical or surgical treatment with 70%-90% success rate; as previously mentioned, depending on the local and systemic conditions of the patient, and performed treatment. The non-surgical approach (Root Canal Treatment) involves the use of a biological, chemical, and mechanical technique to promote the repair and healing of the peri-radicular tissues by the cleaning and disinfection of the root canal system. (Morotomi et al., 2019).

### ***Non-surgical treatment***

The non-surgical treatment starts with a proper access dictated by the anatomy of the teeth, pulp chamber, canal orifices, its position in the arch, dental caries, fracture, filling material obturation, etc.; all these have to be removed to visualize the entire internal structures, pulpal chamber, floor and canals. An effective treatment is attained after the cleaning, shaping, disinfection and obturation of the internal structures of the tooth. If the pathology and its symptoms of the tooth doesn't dismiss after the treatment, a retreatment is indicated. The retreatment consists on removing the previous root canal obturation, to do the procedure again, alleviating signs and symptoms of the pathology, as well repair peri radicular tissues. (Dahlkemper et al., 2013; Ma et al., 2016; Su et al., 2010) The success rate of root canal treatment varies from 42-86% and for endodontic retreatment is 84-88% after 4-10 years follow up. (Chércoles-Ruiz, Sánchez-Torres, & Gay-Escoda, 2017) A non-surgical treatment when is possible, must be the first choice of attempt to improve the tooth condition treatment.

After root canal retreatment the pathology can persist and gradually developed a refractory periapical periodontitis, where signs and symptoms remain it has been reported of 4-15%. (Ma et al., 2016) The solution to this problem is the surgical endodontics treatment which involves different treatments: incision and drainage, trephination, peri-radicular curettage, biopsies, root resection, intentional replantation, and removal of fractured root. All of these have their indications depending on the case. (Dahlkemper et al., 2013; Kim & Kratchman, 2006; Su et al., 2010)

The final step of the treatment is the three-dimensional seal of the canal with gutta-perch, it have two forms of sealing root canals, one is doing orthograde obturation and the second is with thermoplasticized gutta-percha, the first one is associated with use of simply techniques in which can or can't implicate heat or solvents to accomplished adaptation to the root dentin walls, in the technique collocates an amount of gutta perch with cement until the root canal is filled, because

the anatomy of the root canal system it is difficult to achieve places whit the material, so it might left spaces without material. The thermoplasticized is an easier way to achieve this goal, because the gutta-perch is heated until it physical properties changes and can be injected to the root canal, the thing is that many studies shown that it has a porous nature, and its properties contains a moisture absorpction that expands the material and then afterwards contracts the material when it solidifies, which follows good adaptation but still have leakage of bacteria or substances into the canal and peri-radicular tissues. (Sk & Br, 2003). So there are still studies trying to prove the best material to a great sealing and adaptability on the canal root system.

### ***Surgical treatment***

The concept of endodontics surgery starts in 1728 when John Hunter in his book “Treatise on the natural history of the teeth” talked about reaching the end of the root to treat pathologies but was not sure if that was possible. This was a common question among surgeons around the world, how to treat disease in places where they can’t be reach. In the end of the century Dr. Farrar wrote about root amputation, after that apical surgery was described too by Schamber in 1906, performing an osteotomy and a medial root excision on a first molar, using surgical burs to achieve it and radiographs helped as a diagnosis method. (Hargreaves KM, 2011; Winstock, 1980).

The causes of the non-surgical treatment failure could due the complexity of the root canal system, true cyst, foreign body reaction, procedures errors, systemic condition of the patient etc; this technique success rate is of 59-93%, such outcome can be related to the difficulties and complications of the procedures, but it is reported that apical surgery clinical long term healed cases is about 81.5% after 10 years. The surgical procedure involves the access to the site of the problem (infection/endodontic accident) through an incision, flap dissection and osteotomy (if necessary) to deal with the local conditions.(von Arx et al., 2019) ;(Allen, Newton, & Brown, 1989) (Chércoles-Ruiz et al., 2017; I. et al., 2009) (Ma et al., 2016; von Arx, Jensen, Janner, Hänni, & Bornstein, 2019) [Dahlkemper et al., 2013; Kim & Kratchman, 2006; Su et al., 2010].

The objective of the surgical approach is to maintain the tooth the longest it can be in mouth eliminating the etiology of the pathosis remaining in the apical portion, promoting the repair of hard and soft tissue. Apical surgery aims to treat non-healing teeth after a root canal treatment or retreatment therapy and prevent the reinvasion of bacteria and by products from the root canal

system into peri-radicular tissues for the preservation of teeth; by giving a seal to the root canal system, making a barrier of a new material enabling the healing of the peri-radicular tissues and improving the quality of apical sealing (Hargreaves KM, 2011; von Arx et al., 2019) (Chércoles-Ruiz et al., 2017; Tsesis et al., 2013). (Dahlkemper et al., 2013).

The healing potential is the number one concerning after endodontic surgery. If the planning approach is not the indicated for the tooth, it may not have a good recovery and might need another intervention. The indication of a surgical endodontic approach is whether the tooth have clinical signs and symptoms such as painful and positive response to percussion, to palpation, mastication or presence of a sinus tract after treatment or retreatment therapy; also, evidence of periapical pathosis, radiolucency that enlarges with the time, apical thickening of periapical ligament, presence of overextended material in the periapical tissues, persistence lesion, biopsy etc. (Allen et al., 1989; Dahlkemper et al., 2013; Tsesis et al., 2013) The main reason of treatments failure are predominant infections which bacteria plays an important role in the initiation, progression and persistence having a high rate of pathogenicity in infections patrons, primary infections are associated with mixed anaerobic microbiota, and secondary infections have phylotypes microbes, extra radicular colonies, fungi and viruses. (Hargreaves KM, 2011)

### ***Root end filling materials***

A common surgical treatment is the root end resection well known as apicectomy. The traditionally surgical procedure consist in the elevation of a full thickness mucoperiosteal flap, and osteotomy with burs in low high speed under copious saline irrigation, affected root-end resection of 3-5 mm with a bevel in 45° degree, retrograde preparation of 3 mm with burs/ultrasonic eliminating gutta-perch material and refilling the space with root-end filling, which can be performed with gold foils, Mineral Trioxide aggregate (MTA), ethoxybenzoic acid (Super EBA), Intermediate Restorative Material (IRM), Adhesive resin composite (Retroplast), Amalgam, Biodentine and Ionomer glass (Ma et al., 2016; Trope, Lost, Schmitz, & Friedman, 1996; Tsesis et al., 2013; Von Arx, Hänni, & Jensen, 2010).

The filling materials requires a list of physical, chemical and biological physiognomies, such as biocompatibility, bioactivity, dimension stability, insolubility, easy handling, effectiveness, and sealing capacity, to make the surgical procedure a success in long term. (Sk & Br, 2003; von Arx et al., 2019)



Amalgam has been reported since 1884 as a root end filling material, its advantages were easily available, inexpensive, and easy to handle, its success rate of 50 to 80% shown why it was used for many times, this success might be attributed to an improved marginal adaptation at it ages. (Sk & Br, 2003) Nowadays the sealing and toxicity aspects are factor to take in, so in the case of the amalgam leakage, carrion, moisture sensitive and mercury contamination are not associated to be a long-term potential material. (Ma et al., 2016)

Gold foils presents high biocompatibility and good adaptation. Its first report of its used in root canals treatment was in 1913 by Dr. Schuster and 1920 Dr. Lyons; today the use of it is very rare because of it cost and manipulation, and the need of a free moisture environment. (Sk & Br, 2003) They are the gold standard of every obturation.

Zinc oxide eugenol material slowly started to grow into the retrograde restoratives materials because of the need of an ideal apical seal materials such as Intermediate Restorative Material (IRM) and Super Ethoxybenzoic Acid (Super EBA), these materials in vivo studies started to give good results and being superior to amalgam in terms of biocompatibility and sealing. (Ma et al., 2016; Sk & Br, 2003; Torabinejad & Pitt Ford, 1996); (Torabinejad & Pitt Ford, 1996) Super EBA was introduced in 1978 to offer a new formula that can be no resorbable, easy to manipulate, no need of retention cavity and plasticity consist that allow to contact all root walls. The first recipe was made of a powder-liquid component which the powder was composed of 60% zinc oxide, 34% silicone dioxide, and 6% natural resin: 62.5% EBA and 37.5% eugenol. (Oynick & Oynick, 1978). After Super EBA boom a new formula was introduced to make it better, adding 20% of polymethylmethacrylate to the powder, creating IRM. In some comparative studies of both materials, it was seen a 91% for the IRM and 82% for the Super EBA of success rate after 12 months in each group of the study. (Saxena, Gupta, & Newaskar, 2013) Cavit is another zinc oxide based temporary filling that in a time was used in endodontic surgery, because of its easy manipulation and soft characteristic it was thought as a good idea, but it has shown a great solubility in wet surfaces, leakage permeation by the pass of time and low biocompatibility with peri radicular tissues. (Sk & Br, 2003)

In 1968 polycarboxylate cement was introduced and consists of a power modified of zinc oxide with fillers and a liquid of polyacrylic acid solution. The consistent of the mix of both make a hardened and low pH (1.7) material that can be easily manipulated; but it shows questionable tissue response and through time it shows poor sealing ability. (Sk & Br, 2003)

In 1969 Wilson and Kent created glass ionomer cements, which it's a mix of a liquid and powder that contain polyalkenoic acid, that uses homopolymer acrylic acid and aluminosilicate glass powder, with aluminum oxide, silica, and calcium fluoride. This combination set by an acid-base reaction, it is very hydrophilic, long term release fluoride, good elasticity mode, similar to dentin. Despite all the good things it has some disadvantages like dehydration, poor physical and mechanical properties, low wear resistance, and poor marginal adaptation. It is a material that is constantly on modifications and might be a promising root ending filling. (Ching, Luddin, Kannan, Ab Rahman, & Abdul Ghani, 2018; Sk & Br, 2003)

Calcium phosphate cement is commonly known as hydroxyapatite cement, with a two mixture of an acid and a basic compound, it is composed of tetracalcium phosphate and dicalcium phosphate; these compounds are mixed with water forming an isothermal reaction to form a solid texture. Finally, the cement consists of a crystalline material, with an excellent biocompatibility, high strength compressive, maintaining its form and volume long term, porous and radiopaque characteristics (Sk & Br, 2003)

Composite resins are a very versatile material because of its properties and biocompatibility on the nature of its components. There are two specific composite resin-based materials used in root-endings obturations Retroplast (Retroplast Trading, Rørvig, Denmark) and Geristore (Den-Mat, Santa Maria, CA, USA) (Saxena et al., 2013; Sk & Br, 2003). Both resins are BIS-GMA/ TEDGMA based, retroplast has a dentine-bonding agent, it is not condensed into an apical cavity, but just applied into the concave resection surface, with the intention of sealing the outside dentine tubules in contact of peri radicular tissues and inside the canal. Long-term studies using Retroplast shown a 78% of success rate, in which indicates a complete radiographic healing and non-symptomatic tooth. Failure is according to a subjective clinical and radiographic parameter where failure was considered as a persistent periapical pathology, re-operation, symptoms such as pain and fistula drainage (Yazdi et al., 2007). Geristore is a resin composed of fluoride-releasing glass with barium, fluorosilicate, and organic matrix. It's a highly biocompatible, hydrophilic, nonaqueous, low polymerization shrinkage that make it an excellent option as a filling material. (Al-Sabek, Shostad, & Kirkwood, 2005)

Bio-ceramic materials are defined as a ceramic with osteo-inductive properties used in medicine and dentistry (Tawil, Duggan, & Galicia, 2016) (Abusrewil, McLean, & Scott, 2018). Some bioceramics materials are: carbonated hydroxyapatite (HA) ( $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ), amorphous calcium phosphate (ACP), tetracalcium phosphate (TTCP) ( $Ca_4(PO_4)_2O$ ), monocalcium phosphate monohydrate (MCPM)

( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ),  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) ( $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ),  $\alpha$ -tricalcium phosphate ( $\alpha$ -TCP) ( $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), octa calcium phosphate (OCP) ( $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) and Bioactive glass. (Khan & Syed, 2019) The main current employed bioceramic in endodontics is the Mineral Trioxide Aggregate (MTA) a fine powder consisting of tricalcium silicate, dicalcium silicate, tricalcium aluminate, tetracalcium aluminoferrite, and bismuth oxide, it was introduced in 1993 by Mohamed Torabinejad (M. Torabinejad, Watson, & Pitt Ford, 1993), but until 1998 was approved by the American Federal Association (FDA) (Tawil et al., 2016) (Abusrewil et al., 2018) (Islam, Kheng Chng, & Jin Yap, 2006). It is a parent compound of Portland cement (PC); developed by a purification process, resulting in the combination of calcium, and selenium; without presence of aluminum, arsenic and some heavy metals of PC. This material shows a high biocompatibility and was proposed to seal communications between the root canal system and external tissues (M. Torabinejad et al., 1993) (Mahmoud Torabinejad, Higa, McKendry, & Pitt Ford, 1994) (Parirokh & Torabinejad, 2010). (Tawil et al., 2016) (Abusrewil et al., 2018).

MTA has been the material of election for sealing communications and retrograde filling for many years. The reason of this is because of its chemical and physical properties. Chemical properties contain MTA patent composition, involves calcium oxide (CaO), silicon (SiO) and bismuth oxide, some investigations reported silica too, it contains hydrophilic particles that set in the presence of moisture. Currently there are two presentations of MTA: Gray and White. MTA Gray components are mainly of tricalcium silicate ( $\text{Ca}_3\text{Si}$ ), tricalcium aluminate ( $\text{Ca}_3\text{Al}$ ), and tricalcium oxide ( $\text{Ca}_3\text{O}_2$ ) that is mixed up with distilled water, the differences between MTA Gray (MTAG) and MTA White (MTAW) consists of the absence of iron and lower amounts of aluminum and magnesium in the white one. MTAW was created to give a more aesthetic property. (Kim & Kratchman, 2006).

The International Organization for Standardization (ISO) for dental root canal sealing materials ISO 6876:2012, have specific requirements to determined methods such as radiopacity, strength, settings times, solubility, dimensional change, bacterial leakage, etc. these will determine if the materials is suitable for clinical use and applications. (Islam et al., 2006) In the market exists several types of MTA, MTA Angelus from Brazil, Egeo from Argentina, MTA Bio, Light cured MTA, and MTA sealers like MTA-Obtura, etc; all of these presentations have to had the requirements of the ISO, besides its different composition. (Parirokh & Torabinejad, 2010a).

The main differences between Portland and MTA, is the presence of bismuth oxide ( $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ) and lack of potassium in MTA that provides the radiopacity, it has been reported at 7.17mm equivalent of an thickness of aluminum highly acceptable for what ISO and ANSI/ADA requirements. (Parirokh &

Torabinejad, 2010b) ISO and ANSI/ADA have a standardized procedure with an aluminum scale steps in order to analyze the radiopacity of the material, 1mm of dentin is equivalent to 1 mm of aluminum in graduated step wedge; and according to this, ANSI/ADA have a minimum requirement of 57 of its scale that correspond to a 3mm Al. According to the ISO requirements some studies reports that MTA and MTA-G are on the norm, 6.74 mm Al for MTA and 6.47 mm Al for MTA-G. Portland cement doesn't have this radiopacity characteristic with just 0.93 mm Al, today there are studies trying to make this characteristic in it with radiopacifiers like Zirconium Oxide and Zinc Oxide nanoparticles (Borges et al., 2011) (Islam et al., 2006) (Guerreiro-Tanomaru et al., 2014) Radiopacifiers like bismuth oxide affects the particles of calcium hydroxide after the hydration, changing the microstructure of the cement matrix, increasing the porosity and solubility, so it is recommended to use it in pH acid areas or environments such as inflammatory tissues because dissolves easier. It has been reported that MTA have active biomaterials with the potential of being compatible with natural fluids, this might be because of the use of phosphate-buffered saline that are like an in vivo medium, but even though it has a good interaction with peri-radicular tissue, it can be contaminated with blood and affects the morphology and the release of calcium ions, changing color and radiopacity over time. (Duarte et al., 2018) (Parirokh & Torabinejad, 2010). (Guerreiro-Tanomaru et al., 2014)

An important physical property of MTA powder is that the structure transforms after it gets moisturized, which results in a gel that solidifies, making it a hard structure, but the manipulation, mixing and condensation of the material can influence in the structure and its properties. The specific physical and chemical characteristics of MTA could depend of the manufacturer of the product and its indications, but mainly it can be affected by the powder/liquid ratio, method of mixing, pressure of condensation, humidity, type of MTA, storage media, the pH of the environment, the type of vehicle, the length of time between mixing and temperature (Parirokh & Torabinejad, 2010a)

It has been reported that there are chemical and physical properties differences related to the various liquids used in the mix, setting times and solubility are directly affected by moisture. (Duarte et al., 2018) Setting time it's been recalled to be a problem because of its long acting time, it varies from 37-93 minutes depending on the temperature ambient, some of the reports told that mixing its powder with sterile water in a 3:1 proportion would have a setting time of 165 +/- 5 minutes (20 min, faster time reported, at 75°C) until it solidifies, in MTA are longer setting of time because of the lack or lower levels of sulfur and tricalcium aluminate. It is always

recommended to get a hard-solid structure to get the right amount of moisture after the procedure, it helps the setting time. (Sharifi, Araghid, Ghanem, & Fatahi, 2015) Other studies have conducted to overcome longer setting times with different accelerators such as citric acid, lactic acid, calcium lactate gluconate and sodium chloride, these improve setting times but change the compressive strength. The setting time differences between MTAG and MTAW are not clinically significant when used as a root-end filling material, but in the expansion of the material would vary on the MTA that is used and the solution (different liquids) within in mixed (Islam et al., 2006) (Sharifi et al., 2015). Dimensional change or expansion has been shown in all materials on setting, this accounts for a better sealing ability, but excessive expansion is undesirable, it may lead to cracks on the root. Studies compare Hank's solution and sterile water, which reported that MTAG expands more than MTAW, but it's also been reported that MTAG expands less with Hank's solution than in sterile water, and the contrary MTAW expands more in Hank's solution than sterile water, this might be due to the chemical composition between the two formulas. In a study comparing MTAW, MTAG, PC and WPC, in which the greater expansion was shown in WP with 0.47±0.07 % and the less expansion was of MTAG 0.28±0.09%, followed by MTAW with 0.30±0.01 % of the 100% of its started mass. Solubility has been reported at long-term; solubility of a material is defined as the amount of a substance that can be dissolved in each amount of solvent in other words, mass loss, it's reported low or no solubility for MTA (Islam et al., 2006). The solubility of MTAW was found to be significantly greater than PC, and that of White Portland Cement (WPC) significantly greater than MTAG. It has been shown MTAW has a solubility at 7 days of 1.36(±0.69) and 30 days of 4.12(±2.06), compared to Biodentine another bioceramic material, which reported at 7 days 6.72(±0.37) and 30 days of 7.34(±2.08). (Torres, Guerreiro-Tanomaru, Bosso-Martelo, Chavez-Andrade, & Tanomaru Filho, 2018) The powder-liquid ratios affect it, with higher amounts of ratio increased the porosity and solubility. It's reported that using more water would increase calcium release and this influenced in clinical conditions. It has been observed that crystal size of MTAG are larger than MTAW, this is because of the oxygen distributed through the phases and the oxide form of their elements (Parirokh & Torabinejad, 2010a). Porosity is measured and evaluated using microscopy, two dimensional and surface data. Porosity has been highly reported on MTA at 7 and 30 days looking the surface irregular, filled empty spaces, size and distribution of the pores over the surface, this might occur because the amount of water added, entrapment of air bubbles or spaces are non-hydrated during the mixing and the acidic pH environment value. (Torres et al., 2018) (Parirokh & Torabinejad, 2010a)

All physical properties are bond to one another, compressive strength is the capacity to withstand the mechanical forces of condensation and masticatory stress during the used of the filling material until it fractures, an indicator of the setting and hydration process of the material.(Subramanyam & Vasantharajan, 2017) The compressive strength of MTA after 24 hours have a lower rate than amalgam, IRM and super EBA, but after 3 weeks have no significant differences, this happens because of MTA composition which reach it maximum compressive strength after several days. A study by *Islam et al* shown the difference of compressive strength at 3 days and 28 days of different materials, in which MTAG show grater compressive strength that MTAW, PC, and PCW, at both dates due, at 3 days MTAG 50.43+-1.30 MPa, when the other materials achieve between 40-39(+/-2.86) to 48.06 MPa and at 28 days MTAG with 98.62 MPa, other materials 48.53 to 86.02 MPa, showing that the compressive strength increase with the time.(Islam et al., 2006) In another study in which MTA was contaminated by blood and saliva to see what happened, at the third day of incubation the results where MTA (control) have a compressive strength of 157. 87 MPa, and the contaminated with saliva decrease to a 114.70 MPa, and on the contrary the one with blood increase to 176.44 MPa(Subramanyam & Vasantharajan, 2017). Other studies report more compressive strength for MTAW, but the discrepancies of the studies might vary on several factors like the liquid that is mixed, condensation, time of mixing, MTA storage, Ph value and materials & methods of the study.(Parirokh & Torabinejad, 2010a)

The flexural strength could reflect the clinical function and is measure contrary to compressive strength, in which it provides a collective measure to a three-point load, giving us a compressive stress on the upper surface and tensile stress on the lower surface, which we going to focus on the tensile stress. On a study of flexural strength indicated that it is closely related to moisture exposure, in which the greater flexural strength found was at 24 hrs. of 14.27+-1.96 MPa moisten with a cotton in both faces the MTA, followed by 72 hrs. two faced moist with 11.18+-0.99MPa and the lower value was at 24 hrs. one sided moist with 10.77+-1.44 MPa. Even flexural strength is highly related to moisture/hydration and setting time, the ongoing exposure of moist over time doesn't seem to be significant on a better condition of the MTA.(Walker, Diliberto, & Lee, 2006) Another characteristics that have put on the table of the MTA but with non-much of studies, are bonding and retentive strength, in which both are related to the compatibility to stay on the teeth without pushing out , for bond strength they have studies after root canal preparation with 5.25% NaOCl and 2% chlorhexidine (CHX) and Glyde file for 2 hours, the results decreased bond strength to dentin, another study investigated the bond strength of WMTA to composite, placing total-etch on

the composite and it shows higher bonding strength, but it doesn't show significant clinical information, and for MTA retentive strength there are no results that indicates or revealed a good strength too.(Parirokh & Torabinejad, 2010b) Even though bonding and retentive strength are not on top, the displacement that is the capacity of moving away from its place or position have been studied too, in which the study showed that the thickness of the material is related to this, reporting that 4 mm thickness are mores resistance than 1 mm at greater forces and that this characteristic increase at the time pass by.(Hachmeister, Schindler, Walker, & Thomas, 2002) The pH coefficient indicates the acid or alkalinity grade of solution; MTA pH value is report to be after mixing 10.2, and this rises to 12.5, 3 hours later.(Torabinejad, Hong, McDonald, & Ford, 1995) One study evaluated pH on PCW, MTAG, MTAW and PC over time until 70 minutes pass, I which it showed that WP have the pH alkalinity at 13.2, then PC, MTAW, both with 13 and finally MTAG with 12.8 at 70 minutes.(Islam et al., 2006) As many of the different characteristics of MTA, hardness it's going to be led by the powder-liquid ratio, amount of strength in condensation and porosity. It has been studied MTAG and MTAW with different thickness, 2 mm, and 5 mm, and the thicker it is, the harder it gets. In compared with PC, MTAW showed more hardness. As fracture resistance studies, have shown good results increasing its resistance in comparison to other root fillings materials, after 1 year of use. Another property that distinguish MTA its antibacterial and antifungal properties; In many studies have showed the effect on facultative bacteria, strict anaerobes, and fungal species, but it also showed limited action on them, so it's a controversial property. . (Parirokh & Torabinejad, 2010a)

Biodentine is one of the newest materials on the market introduced in 2010 by Gilles and Oliver as a dentine substitute. It has different clinical applications as in dentine repair treatments (large carious lesions, indirect and direct pulp capping), root treatments (root canal perforations, resorptions, apexifications, and retrograde root canal obturation). Biodentine is a tricalcium silicate-based material ( $\text{Ca}_3\text{SiO}_5$ ), in a presentation of powder and liquid solutions, where the powder is mainly composed of tricalcium silicates, di-calcium silicates, calcium carbonate and oxide as filler, it also contains Zirconium as a radio-opacifier for a better location on radiographies.(About, 2016; Rajasekharan, Martens, Cauwels, & Verbeeck, 2014) (Hiremath, Kulkarni, & Naik, 2015)The liquid is a mix of calcium chloride and hydro soluble polymer; water that acts as the reducing agent. The mix of the materials must be done with an amalgator, creating a hydration reaction, precipitating the calcium silicates, and creating a hydrogel, which overtime continues precipitating on the silicates

and decrease the porosity and increases the compressive strength. Biocompatibility with oral tissues is well investigated to ensure its safety use, it have been studied on human pulp cells, direct pulp and indirect pulp, in each of the conditions it was not found to affect the cells variability , it have also been studied on odontoblast to see its reaction, and what have been found is to induce the capacity of mineralization, and the absence of toxicity on them. (About, 2016)

The physical and mechanical properties are stable and become better over time, compressive strength after 35 minutes become an amount of  $10.6 \pm 2$  MPa, and  $57.1 \pm 12$  and  $72.6 \pm 8$  MPa after 24 hours and 28 days respectively; its flexural strength is of 34 MPa, elastic modulus of 22,000 MPa, its porosity is of 7.09, and it increases over time, because of the precipitation on the empty spaces on the mix of the silicates. Its Ph is alkaline and changes over time, two different studies shown dissimilar values as time goes by, the first day they showed values of 8.88 and 11.7 and over a week the results were 8.02 and 12.1.(de Vasconcelos et al., 2009; Grech, Mallia, & Camilleri, 2013; Rajasekharan et al., 2014) Because of the several applications that Biodentine have, the push out bond strength is studied, that it is the capacity of the material to stay in place when a force is applied within the contact of several fluids or surfaces. The study evaluates the immersion which it was irrigated before putting the materials that were 35 % sodium hypochlorite, 2 % Chlorhexidine or saline solution for 30 min, and the results where an average of  $7.15 \pm 8.5$  MPa, however irrespective the solution it takes a force significantly higher to displace the material. Another material that have been studied on push-out strength is blood contamination, in which showed that had no significant effect on the material.(Guneser, Akbulut, & Eldeniz, 2013; Rajasekharan et al., 2014)

Biodentine has shown to be bio-compatible with oral tissues; cytotoxic potential has been studied with the method Conditioned Biodentine Medium (CBM) following the recommendations on ISO 10993-12 by the use of colorimetric 3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay, in which the proliferating culture is measure and its viability. In this study the conditions are evaluated in percentages, by the relative metabolic activity, it was calculated as follows:  $\text{metabolic activity (\%)} = (\text{OD of cultures with CBM} / \text{OD of cultures with control fresh medium}) \times 100$ , so results shows undiluted (100%) and 75% CBM were severely cytotoxic, 50% CBM induced moderate cytotoxicity, whereas 25% CBM and lower concentrations were non-cytotoxic, besides this parameters the results can be different in one study to other, because of the cell-line that is used. But because of all that different data, its reported to be non-cytotoxic in lower



concentrations and can have anti-inflammatory, immunoregulatory and osteoprotective properties.(Eraković et al., 2020)(Kaur, Singh, Dhillon, Batra, & Saini, 2017)

Antifungal and antimicrobial properties have been documented too, it is because the highly alkalinity of the pH, as it said before it improved over time reaching up to 12.8 making hard the growth of the microorganism. It's have been proved by different studies, Both studies shown that Biodentine have higher antifungal and antimicrobial properties against *E. Faecalis* and *Candida albicans*(Bhavana et al., 2015; Hiremath et al., 2015; Kaur et al., 2017)

### ***Microbial Culture***

Microbiology is the science that study, analyze, and evaluate different types of organism that are difficult to the human eye to observe, like: bacteria, fungi, protists and parasites and other agents such as viruses, viroid, and prions. Microorganism as bacteria and fungi species have a close relationship with periapical pathosis, that can or cannot be associated with pulp diseases, causing a chronic inflammation and tissue necrosis. Biofilm is when different species of bacteria and fungi interacts creating a community with metabolic product such as proteins and carbohydrates, and over time other species start to attach too, making the microbiome more pathogenic causing the diversity of species increase, going for aerobes to anaerobes or it can be defined as “a polymicrobial three-dimensional community of numerous microbial species, embedded in a matrix that consists of microbial metabolic products and/or host component” too, depending on the author. (Willems, Xu, & Peters, 2016) (Levin, Law, Holland, Abbott, & Roda, 2009; Willems, Xu, & Peters, 2016)

This interaction of microbes must have a host in which they can supply their needs. In oral cavity it can be in different places as tongue, teeth, gingiva, etc. On teeth some studies indicated that bacteria could invade intra-radicular and extra-radicular areas including cementum and root apex. Because of the inaccessible area's microorganisms can reach, this pathosis can remain after several treatments. Wang et al, in a study demonstrated that 26 different species can be found in extra-radicular biofilm, and concluded that “A multi-bacterial community, including *Actinomyces* and *Propionibacterium*, seems to participate in the maintenance of persistent periapical pathology” but this required further investigation because in every individual might change the type of bacteria in the microbiome.(Wang, Jiang, Chen, Zhu, & Liang, 2012; Zhang, Wang, Zhang, & Soo, 2010)

Periapical lesion persistence has a therapy resistant infection, with microorganism in the entire root canal system, lateral and accessory canals, ramifications, dentinal tubes and even outside it, cementum, peri radicular tissues and root external walls in an 83 % of the cases. Microorganism

forms a biofilm with characteristics that differ from the planktonic form, this occurs because the microbiota survives, their products and byproducts make the environment ideal to the multiplication and progression of the microorganism, besides these characteristics that establish the biofilm had to have the followings too, adherence to dentinal tubules and debris, ability of attachment to other bacteria, co-living and coaggregation to bacteria and surfaces. (Wang et al., 2012) (Leonardo, Rossi, Silva, Ito, & Bonifácio, 2002) (Wang, Jiang, Chen, Zhu, & Liang, 2012).

As mentioned above, biofilm formation has to have characteristics and behaviors that creates the ability to survive, biofilm formation can be viewed as a development process governed by an adaptive response of bacteria. Biofilm formation goes from a planktonic form to a colony which requires from the creations of extracellular matrix and adhesins to create a biofilm matrix, the creation or formation involves different stages as i) Adherence of microorganism to surfaces or to each other, ii) Formation of microcolonies, iii) Biofilm maturation and iv) Biofilm growth and dispersion. The initial biofilm response is to the environment, that can be increase of c-di-GMP that is an intracellular messenger that activates the creation of components of extracellular matrix and adhesins or regulating the RNA's decreasing the proteic activity. Its architecture and organization are in microcolonies that is the basic unit of biofilm, but it depends on the species and the nutritional conditions of the environments. The formation is an adaptive response of individual bacterial but at group level we can see activity too and this increases the survival and the adaptive traits of the bacterial, creating a protective biofilm or increasing the adhesiveness of single bacteria allowing them to persist in specific environments. (Tolker-nielsen, 2015)

Apical periodontitis post treatment is an inflammatory disease caused by a persistent infection after the root canal treatment, it can be caused by medication resistant bacteria, extra radicular infection, periodontitis bacteria, bacteria entry during the treatment, etc. (Al-Hezaimi, Naghshbandi, Oglesby, Simon, & Rotstein, 2006). (Provenzano et al., 2016) The results of what microorganisms shown to be more present in non-healing cases can be so different because of the methods used in each research for example; metaproteome (protein study), culture and molecular studies show that the high prevalence of *Enterococcus* species on root apex and lesions, the *Enterococcus faecalis* is one of the most frequent pathogen species detected, some microorganism (moo) that have been identified in post-treatment apical periodontitis too are *Actinomyces species*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, and *Candida albicans*. (Signoretti et al., 2011) Culture-based studies shown the microbial flora is limited to facultative gram-positive such as

*Enterococcus*, *Actinomyces* and *Propionibacterium*, but molecular method shown more anaerobic bacteria that can be more hard to identify and difficult to grow, such as *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *P. endodontalis* and *Fusobacterium* (Zhang et al., 2010). To see what this persistence biofilm is made of, several studies have been done and shown different microorganism patterns. Signoretto et al. results reported species like *Actinomyces naeslundii* and *Actinomyces meyeri*, *Propionibacterium propionicum*, *Clostridium botulinum*, *Parvimonas micra*, and *Bacteroides ureolyticus*. (Signoretto et al., 2011) Jia-De et al show that the most prevalent bacteria were *Peptostreptococcus micros* and *Fusobacterium nucleatum*, followed by *Enterococcus faecalis* and *veillonella parvula*. (Jia-De & Huji, 2009) Another study dominated *P. endodontalis* 45 %, *Actinomyces viscosus* 42 %, *Candida albicans* 36 %, and *Porphyromonas gingivalis* 27%, followed by *Enterococcus faecalis* with a 15% of the samples. (Zhang, Wang, Zhang, & Soo, 2010).

Enterococci are gram positive cocci, facultative, anaerobes that can be singles, pairs or short chains, with ability to grow at 10°C and 45°C, with a pH of 9.6, in 6.5% NaCl broth, and survive 60°C, and live in the presence or absence of oxygen. (Kayaoglu & Ørstavik, 2004) (Souto & Colombo, 2008) *Enterococci* species are divided in five groups depending of its interaction with mannitol, sorbose and arginine. *Enterococcus faecalis* is a gram-positive facultative bacterium specie, of the same group as *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, and *E. gallinarum*, which form acid in mannitol and hydrolyze arginine. (Stuart, Schwartz, Beeson, & Owatz, 2006) Is one of the most pathogenic bacteria that have been found in non-healing periodontitis cases over the time and is considered the primary causal of failed root canal treatment (Chen et al., 2018); *E. faecalis* it's a facultative anaerobe, that can grow in the presence or not of oxygen, can be in pairs, single or short chains. Mostly are found in oral cavity and genital tracts. It survives at very harsh environments, can grow at 10°-45° C temperature and survive to 60° C for 30 minutes; all these characteristics make *E. Faecalis* able to survive and translocate from the root canal to other areas and play a very important role on opportunistic infections, but in oral cavity is a normal inhabitant microorganism. Its prevalence on mouth increase with the root canal treatment, as I said before it is related asymptomatic chronic peri-radicular lesions, its prevalence in primary infection is of 40% and in secondary increase up to 77% and positive found isolated in 23-70% of the isolated cultures. (Kayaoglu & Ørstavik, 2004). *E. faecalis* lives in a vast colony-forming unit (cfu) of  $10^5$ - $10^8$ , it survives at very harsh environments, because of an extracellular polymeric matrix, quorum-sensing, transduction system, and sugar binding transcriptional regulators that makes resistant the bacteria

to medication and in its planktonic state is approximately 100 to 1000 times more resistant. Intracanal medications such as calcium hydroxide, are very effective to reduce and eradicate bacteria in apical periodontitis, because the release of hydroxyl ions (OH<sup>-</sup>) making a pH of 13.5, highly alkaline having the ability to damage bacteria DNA, but *E. faecalis* is alkaline resistant and cannot be killed, this is one reason it's always in the re-infection cases. Another reason in that fits in a group of microorganisms that have an adaptative and survival mechanism of defense, that make them live under unfavorable conditions, this method is called viable non-cultivable; in which the bacteria are alive but cannot grow colonies or create biofilm on conditions that usually can, in this state the microorganism changes morphologically and metabolically modifying its virulence potential and gene expression, this state can stay the same for many years, until under certain circumstances can resurrect or come to its initial form abandoning the non-cultivable state. Some authors think this is the main reason that *E. faecalis* is such a resistant bacterium and is always found in harsh environments. (Dahlén, Samuelsson, Molander, & Reit, 2000, Chen et al., 2018),(Kayaoglu & Ørstavik, 2004; Stuart et al., 2006) (Tamagnini & Paraje, 2015)

*Enterococcus Faecalis* have a prevalence of 24% to 77% in asymptomatic persistent infections. What makes *E. faecalis* virulence factors its adherence to the host cells, expressing proteins allowing it to compete other microbes and alter the host response, suppressing lymphocytes action, making the treatment to fail. But what really makes the disease being so strong and persistence is the capacity of survival; it's have been shown it can be in dentinal tubes with calcium hydroxide for over 10 days, and meanwhile is able to keep forming biofilm that helps to be more resistant. *E. Faecalis* do not resist to environments with basic pH greater than 11.5, so it's very unlikely that calcium hydroxide has effect on it when there are in dentins tubes(Stuart, Schwartz, Beeson, & Owatz, 2006). Other treatments have been effective to eradicate or prevent the *E. Faecalis* to get into the dentinal tubes, one of this is to make bigger preparation so it could be easier for the medication to enter, penetrates and facilitates its removal. Sodium hypochlorite, ozonated water, stannous fluoride, EDTA and chlorhexidine are effective at reducing or eliminating *E. Faecalis* from root canal individually or on combination. A protocol that have showed good results on two days appointment to eradicated *E. Faecalis* is an adequate instrumentation where you increase the apical preparation size to let the irrigants pass through, which are going to be 10 ml Sodium Hypochlorite at 6 %, EDTA at 17 % and Chlorhexidine at 2% in between of each irrigants you have to irrigate with physiologic water; the intracanal medicaments is going to be a mix of chlorhexidine gel at 2 % and calcium hydroxide, it

can be heated to have better action on the microorganism, but besides all these effective irrigants and medicaments it can still survive (Stuart et al., 2006).

The study of the behavior of these microorganisms is done in laboratories, allowing the microorganism to grow and create biofilm, it is necessary to provide them with a culture medium with nutrients and appropriate physicochemical conditions for their development. The components for the culture mediums are, a source of nitrogen that can be hydrolyzed proteins or peptones, carbon (CO<sub>2</sub>), Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, vitamins, and a pH buffer. The medium cultures come in different presentations and each one has its indications depending on the microorganism that is going to be studied.

- Liquids (broths): doesn't contain any gelling agent, the growth is faster since that mobility allows easier access to nutrients.
- Semi-solid: They are those that contain a proportion of agar less than 0.5%.
- Solid: They have an agar content of approximately 1.5%. Growth develops on the surface of the medium and are deposited in Petri dishes or in test tubes.

Some strict aerobic microorganisms can grow on the surface of agar plates and in the upper part of liquid media, but if you want to obtain aerobic organisms in large quantities, the exposure of the medium to the atmosphere must be increased. The ventilation increases by constant agitation of the inoculated liquid medium and introducing sterile air in the middle. For strict anaerobic bacteria that are inhibited by contact with oxygen (O<sub>2</sub>), we must change its redox potential (Eh) so they can start growth, most anaerobic bacteria are inhibited to Eh values greater than -100 mV, and some do not start their growth with potentials greater than -330 mV. To reduce the media is used cystine, thioglycolate or Na<sub>2</sub>S, to achieve this on the liquid cultures, it uses tubes, flask, or anaerobes chambers (Brewer, Torbal, Gas Pack, etc.) all these have the same principle. Microorganisms need many things so they can live, water is one of them and for anaerobes the creation of hydrogen reduces the oxygen on the environment and forms water, then the use of a catalyst inactivates metabolic products and the excess of humidity to create a better environment for the microorganisms. But this environment can be influenced by different factors that can rate the bacterial growth, temperature, pH, oxygen concentrations, nutrients, etc. So, it is important to know the needs of the microorganism that we are working with.

When bacteria are grown in an environment whose composition remains constant because they are added continuously nutrients and waste products are removed, exponentiating growth and the

mass is constant is called continuous culture. These can be achieved with chemostats and turbidostatic cultures. The first one, culture aliquots are removed and replaced with a fresh culture medium containing nutrients and the turbidostatic has a photocell that regulates the flow rate of the medium to maintain a predetermined turbidity. These cultures are ideal to simulate natural conditions in studies.(Cerra et al., 2013)(Pérez, 2016)

Another form in which culture can be grown is by the dynamic of fluids, that is based on the movements of the bacterial environment, these movements help to recreate the environment in which the bacteria is used to and can grow. The dynamic fluids have two different types of flows, can be laminar and turbulent, what makes the difference is the effort and the speed in which the fluid is subjected. Laminar flow movement is stable, sharp and in a low speed. For turbulent flow, the movement is chaotic, non-coordinated and fast. The Reynolds number (NR) is the measure that rates the flow, is related to the density, viscosity, speed, and typical dimension of a flow in a dimensionless expression; diverse studies have shown that the Reynolds number that are less or equal to 2000, the regime is laminar, while above 3000 the regime is turbulent, but this can vary depending on the criteria of each environment. The most used method to recreate laminar flow is with an airflow cabins, which can have many uses, as in to reduce airborne microbial counts in medical research laboratories, surgical amphitheatres, intensive care units, and animal colonies. A laminar Flow hood works passing air from back to front through a HEPA filter which removes dioctyl phthalate particles with a diameter of 0.3  $\mu$ m. the air left the filter at an average velocity of 100 ft (30.48 m)/min and traveled horizontally through the hood with minimum turbulence, or "laminar" air movement. (Coriell & McGarrity, 1970)

Bacterial growth can be identified by means of a series of microbiological tests: colonial morphology, cell morphology, positive bile-esculin test, oxygen tolerance and growth in 6.5% NaCl BHI broth

- Colonial morphology in Müller Hinton agar plates. Samples of BHI broth retrieved from the test apparatuses, cultured paper points and bacterial inoculum were collected, seeded onto agar Müller Hinton plates (Merck, Darmstadt, Germany) and incubated at 37°C for 24 hours to verify the occurrence of *E. faecalis* growth by analysis of colonial morphology.
- Cell Morphology. After agar plate culture, smears were prepared on glass slides and stained with Gram's Method to identify microbial morphology.
- Gram stain: which consist in the pigmentation of bacteria recognizing the Gram positives bacteria and Gram negatives (GN), based on the bacteria structure, the first ones retain the

blue-violet staining, and the GN are discolored and then stained with safranin which is a red-pink stain.(de Paz, 2007)

To measure the biofilm formation exists different and several qualitative and quantitative methods, some are based on techniques that can only monitor the increase or decrease of it, while other provide other information as the chemical properties. Some methods are: Quartz crystal microbalance, large area photometry, electrical capacitance, fiber optical devices, turbidimetry, light scattering, heat transfer, pressure drop, radiation signals, photoacoustic spectroscopy, bioluminescence assay, redox probes, fluorometry, etc. Some of these methods require removal of the biofilm and be subjected to another culture to measure it.(Maurício, Dias, Jubilado, & Santana, 2013)

### ***Scanning Electron Microscope***

To evaluate and observe the smallest details in things, we must magnify the picture. Scanning Electron Microscope (SEM) can visualize structures with high resolution, allowing us to reach of 10x to 130,000x of magnification, and have a distinct ability to examine dimensional topography, its elemental composition, and the distribution of the features of the sample. To create the topography image is achieved not by optical focusing but by time sequencing, this means that it needs a scattering of electron, in which the bomb of electrons generates a black and white image from the bouncing of electrons that goes on and off, requiring a vacuum so the electrons can be focused and directed to the sample to produce the image, the vacuum prevents the electrons to make contact with particles and molecules that can interfere with the image quality. The electron bombardment after the bounce off of the sample have another two different positively charged image detector and translate it into a characteristic X-ray, and disperse X-ray spectrometry that the SEM can read to map the composition of the elements of the sample.(Fischer, Hansen, Nair, Hoyt, & Dorward, 2012; Hayes & Pease, 1968; Nguyen & Harbison, 2017)

The SEM can view to types of samples the conductive and desiccated, non-conductive, and desiccated or wet (organic, biological, crystals and polymer). The first one can be secure on a pin stub mount and easily managed, the second ones must be coated with a conductive layer to protect the sample. This coat is a layer of gold or silver, making a conductive coating on the sample. In the case of biological samples, they are processed by dehydrating with alcohol or acetone, later they

**“EVALUATION OF BIOFILM FORMATION OVER MTA AND BIODETINE SURFACE AS ROOT END FILLING MATERIAL; AN INVITRO STUDY”**

are dried by the critical point method (CPD, Critical Point Drying) and finally metallized. CPD is a drying method that allows the cell shape and structure of the sample to be preserved. It is based on the replacement of liquids (used in fixation, and dehydration: initial conservation processes) by CO<sub>2</sub>, which is evaporated under certain conditions of temperature and pressure without damaging the tissues of the sample.(Fischer et al., 2012; Hayes & Pease, 1968; Nguyen & Harbison, 2017)



## **JUSTIFICATION**

Nowadays the success rate of endodontic therapy is up to 97 % and retreatment therapy is up to 80 %. The success of the endodontic surgery will depend on the case selection, host, diminish bacteria, removal of all necrotic tissue, complex of the anatomy, root filling material, sealing and operator techniques. There has been reported that MTA Gray, MTA White and Biodentine has adequate antibacterial and antifungal properties, but until now there are not reports about the formation of biofilm over the surfaces after apical retro-obturation. The aim of the study is to evaluate the biofilm formation over the materials surfaces as root-end obturations *In Vitro*. (Pannkuk, 2011)(S. Kim & Kratchman, 2006) (Agrafioti, Tzimpoulas, Chatzitheodoridis, & Kontakiotis, 2016)

### **Research Question**

Could bacterial biofilm form on the surface of bioceramics materials after the retro-obturation?

## **OBJECTIVES**

### **General Objective**

- Evaluate the presence of *E. faecalis* biofilm formation over MTA Gray, MTA White and Biodentine surface *In Vitro*.

### **Specific objectives.**

- Simulate retrograde preparation and retro-obturation (Biodentine, MTAW and MTAG) on dentin disk of extracted teeth.
- Culture *E. faecalis* to create biofilm on the surfaces of MTA Gray, MTA White and Biodentine.
- Observed and evaluate by SEM the presence of bacterial Biofilm.

## **HYPOTHESIS**

**Hi:** *E. faecalis* biofilm can be observed and formed over the surfaces of MTA Gray, MTA White and Biodentine used as root-end filling material.

**H<sub>0</sub>:** *E. faecalis* biofilm will not be observed and formed the surfaces of MTA Gray, MTA White and Biodentine used as root-end filling material

## **METHODOLOGY**

### **Study place**

- Laboratory of microbiology of the “Maestría de Endodoncia” of the “Universidad Autónoma de San Luis Potosí”. Mex.
- Installations of the “Maestría en Ciencias Odontológicas” of the “Universidad Autónoma de San Luis Potosí”. Mex. (to be defined).
- SEM Laboratory of the “Universidad Autónoma de San Luis Potosí”. Mex. (to be defined).

### **Study Design**

- Observational *In Vitro* study (Manterola, Quiroz, Salazar, & García, 2019)

### **Sample Selection Criteria**

- Caries-free uni-radicular premolars extracted for orthodontically reasons.

### **Sample Exclusion Criteria**

- Premolars with root fissures.
- Premolars with root fractures.
- Premolars with irregular anatomy.
- Premolars with a root angle > °35.

### **Sample Elimination Criteria**

- Samples where the retrograde preparation can't be perform.
- Samples in which the retro-obturation can't be perform.
- Fractured premolar roots in the process of dentin disk cut.
- Fractured dentin disks

## Variables

VARIABLE	CONCEPTUAL DEFINITION	OPERATIONAL DEFINITION	MEASUREMENT SCALE
<b>Independent</b>			
MTAG	Bioceramic material used on the surgical procedure as a retro-obturation sealer.	Mix of the material following the commercial house instructions	Qualitative nominal variable
MTAW	Bioceramic material used on the surgical procedure as a retro-obturation sealer.	Mix of the material following the commercial house instructions	Qualitative nominal variable
Biodentine	Bioceramic material used on the surgical procedure as a retro-obturation sealer.	Mix of the material following the commercial house instructions	Qualitative nominal variable
<b>Dependent</b>			
Biofilm	Create adherent capacity by the formation of extracellular polysaccharides on the surface of the bioceramics	Observational evaluation by SEM	Qualitative nominal

(Ttesis, Elbahary, Venezia, & Rosen, 2017)

## **Ethical Considerations**

-The research project follows the requirements of the Official Mexican Standard norm PROY-NOM-087-ECOL-SSA1-2000, which mentions the management specifications of the Biological- Infectious waste for the environmental protection, in which all our products fit in this category.

- Consent of the clinic “RIO Clínica Dental Integral, Saltillo, Coah. MEX.” clarifies the authorization from the patient to use the extracted tooth for medical research.

- The investigation is endorsed by the ethics committee of the “Universidad Autónoma de San Luis Potosí”, which authorized the use of materials and procedures for this *In Vitro* research.

## Experimental Phase

The experimental phase was divided into the following stages (Fig. 1):

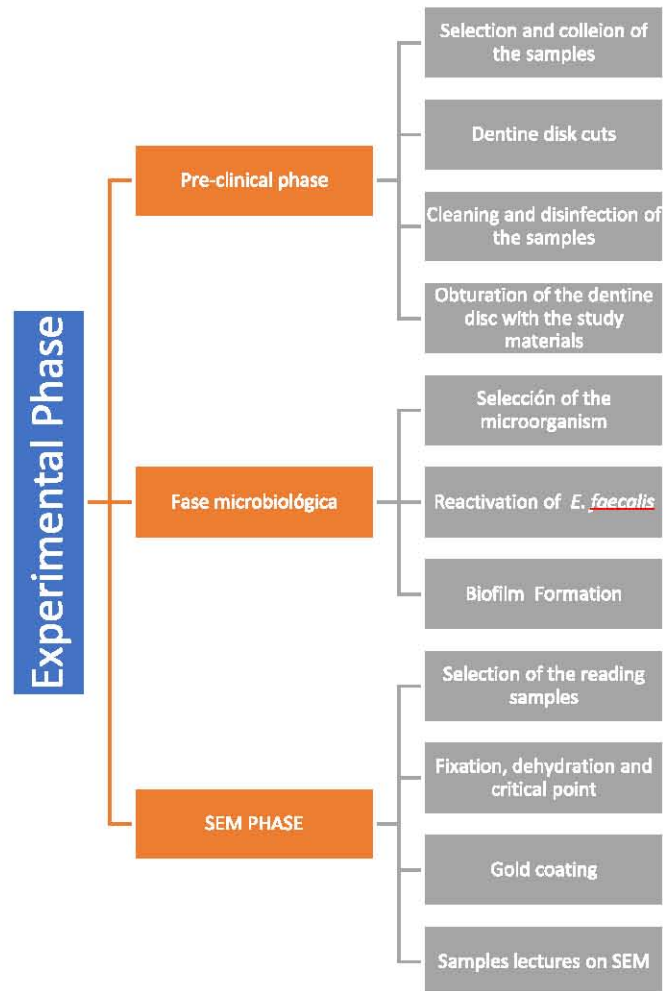


Figure.1 Experimental phases

### Pre-Clinical Phase

#### Sample's preparation

37 teeth (premolars) extracted due orthodontic reasons, the use that is given to the tooth after the extraction have the consent of the clinic in which each tooth was extracted. The teeth will be collected and placed in sterile saline solution and stored at -4°C until use.

**“EVALUATION OF BIOFILM FORMATION OVER MTA AND BIODÉTINE SURFACE AS ROOT END FILLING MATERIAL; AN INVITRO STUDY”**

Perform cuts separating coronal and radicular parts over the extracted teeth using diamond burs and disks to uncrown the teeth.

Obtain 3 dentin disks from each root of extracted teeth: recollecting 125 dentin disks in total, 30 for each group of samples and 5 dentin disks for each control group. They were cut with a diamond disk at 3 mm of width to simulate the retro-obturation.

Perform retrograde preparation, using a diamond bur (E32D) with the ultrasound system (Varios NSK)

Applicate disinfection of the root canal, using irrigating solutions of NaOCl 2.25%, EDTA 17% and saline solutions for 4 minutes in the Biosonic UC50 ultrasound, 30 htz, until the it doesn't present turbidity. (Fig. 1)



*Figure 1. Biosonic UC50, disinfection of the samples.*

The samples were placed on filter paper for drying and placed in bags for sterilization. (Fig. 2)



*Figure 2. Dentine Disc samples.*

The dentin discs sample were sterilized in a humid heat autoclave for 20 min at 121 ° C.

*Ruiz Flores A.*



Dentin disks were obturated and sealed with Biodentine, MTAG and MTAW (30 dentin discs in each material) and four groups control with gutta-perch and Biofilm and the obturation materials (5 dentin disks in each control group).

The mixing of the materials was done according to the indications of the commercial house. The Biodentine was placed 5 drops of liquid with a capsule, the amalgamator was used to mix it for 30 sec. The mixing of the Gray and White MTA was carried out in a 2: 1 liquid-powder ratio for 40 seconds (Fig. 3)



*Figure 3. Obturation material placement.*

## **Microbiology Phase**

### ***E. Faecalis* reactivation**

*E. faecalis* was used as a microorganism in the project. which was obtained from the laboratory of the Maestría in Endodoncia UASLP, which were isolated from patients with persistent apical periodontitis. *E. faecalis* was stored on solidified fluke-beak agar at 4°C under refrigeration until it uses. (Fig. 4)



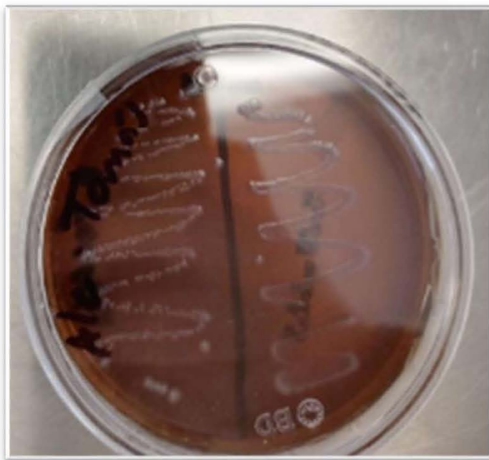
*Figure 4. Cepario of the laboratory of the Maestría en Endodoncia, UASLP.*

Four strains of *E. faecalis* were selected for reactivation in order to use the one with the highest degree of identification.

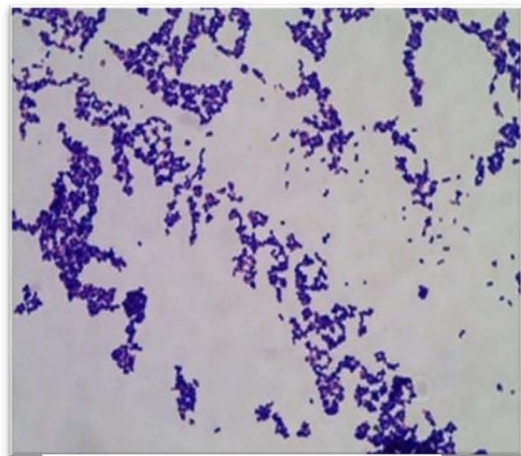
In a sterile environment, using the laminar flow hood, a sample of the microorganism was taken and seeded in the tube with Brain Heart Infusion (BHI) sterile culture medium, distributing everything throughout the medium.

The tubes were subjected to an incubation period for 48 hrs. at 35 ° C + -2, in a bacteriological oven. After 48 hrs. The tube that showed the best development was selected to carry out the experimental phase. To maintain the microorganism alive and pure, it was seeded on a blood agar plate, performing reseeds to keep the microorganism viable until its use. (Fig. 5)

The macroscopic observation of the development of the colonies was carried out by means of the stereoscopic microscope at a magnification of 40x, later the microscopic observation by gram staining in an optical microscope at a magnification of 100x. (Fig. 6)



*Figure 5. E. faecalis Agar plate*



*Figure 6. Gram stain E. faecalis*

Subsequently, an identification metabolic test was done with API 20 Strep system, which result of 99% of identification.

### **Biofilm creation**

Once the strain is reactivated, an inoculum of the *E. faecalis* microorganism is prepared at a McFarland scale of 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  / ml), where it was checked with the spectrophotometer at 625 nanometers with an equivalence of .085 absorption units. Of this inoculum, 200 ul were added in 30 ml of BHI.

The culture medium was in Brain Heart Broth (BHI), which was prepared with 37 g per 1000ml, each time it was necessary. Always sterilized for the used.

Once the culture medium was prepared with the *E. faecalis* inoculum, the dentin discs were placed with the material to be tested and collocated on tubes with the culture medium and the microorganism and incubated for 48 hrs at 37 ° C. (Fig. 7)



*Figure 7. obturated samples with E. faecalis inoculum.*

This procedure was repeated for 21 days, changing the culture medium every 48 hours. These replacements consisted of changing the dentin discs to a new tube with 30 ml of sterile culture medium.

All these processes were carried out in a sterile environment inside the laminar flow hood (LABCONCO)



*Figure 8. Laminar flow hood  
LABCONCO*

### **Analysis Scanning Electron Microscope**

Samples preparation for the observation on SEM.

Cell fixation was done by adding 2.5% glutaraldehyde in buffer 0.1 M sodium phosphate and leaving them in contact with the fixative solution for 24 hrs at 4°C. Once this period concluded, the fixing solution is eliminated and washed it with the sodium phosphate buffer. (Fig. 9)



*Figure 9. Fixation of the samples*

Bacterial cells were dehydrated by passage of 10 minutes through a series of alcohols, started with 20%,40%, 60%, 80% ,90%, 95% alcohol and finally absolute alcohol for 24 hrs or until it used. (Fig. 10)

*Ruiz Flores A.*

**"EVALUATION OF BIOFILM FORMATION OVER MTA AND BIODETINE SURFACE AS ROOT END FILLING MATERIAL; AN INVITRO STUDY"**

The cells are subsequently subjected to critical point drying (Leica EM CPD 030) attaining to 7 cycles with acetone and CO<sub>2</sub>. (Fig. 11)

The samples were mounted and sealed with carbon tape in devices or pins for reading where, in the Fine Coat Ion Sputter JFC1100 JEOL, the gold bath was performed for 80 sec. The gold bath is necessary for SEM visualization, since it has a positive charge that causes a reflection when colliding with the electrons that scatters the microscope's tungsten filament, providing us with a three-dimensional image with different magnifications.



*Figure 10. Samples Deshidratation*



*Figure 11. Critical Point Leica EM CPD 030*

Evaluation by SEM the presence of biofilm over the surface of disks, in different scales of resolution 20x, 2500x and 5000x.

Evaluation and observation of the results by SEM, after 21 days of bacterial culture, randomly select from each group of samples a representative number of dentin disk to make the analysis. (Fig. 12)



*Figure 12. SEM Lecture*

*Ruiz Flores A.*

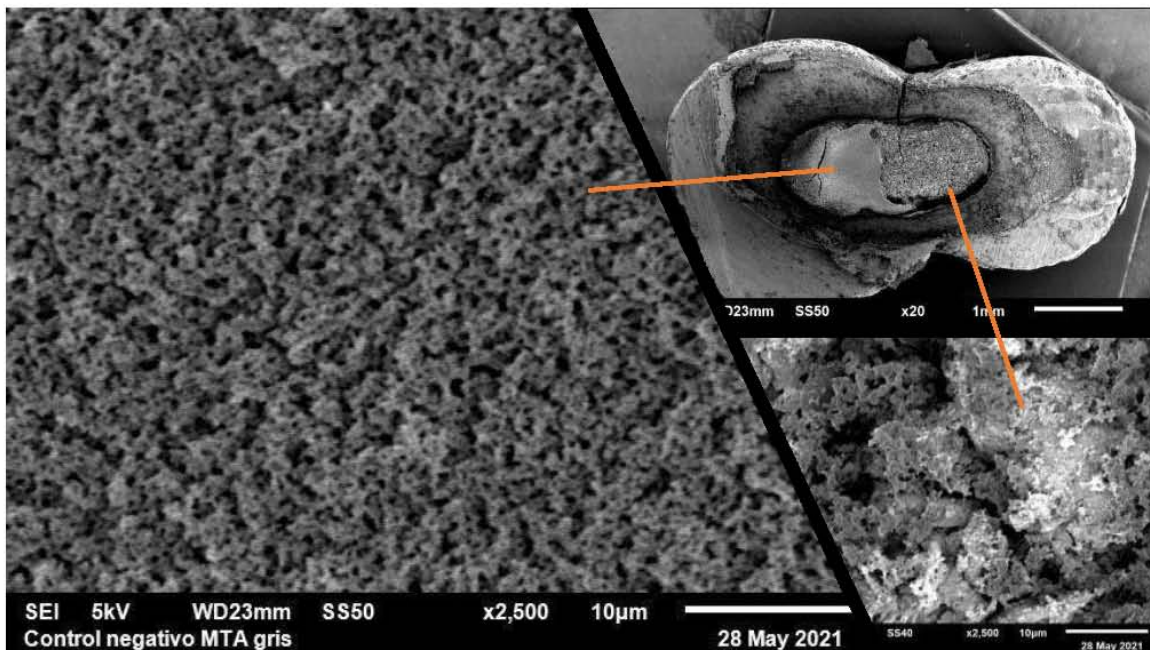
## **Results**

The results of the studied groups were analyzed as follows: Observation and analysis on SEM of the experimental groups and control groups.

The experimental samples as the controls were observed after a period of 21 days of bacterial incubation with *E. faecalis*, and biofilm was developed. The samples were taken to the scanning electron microscope (SEM) for observation with secondary electrons at 5 kilovolts, and at different magnifications, which were 18x, 20x, 2500x, and optical findings at 3000x and 5000x. Different surfaces of the dentin discs were evaluated, which were the surfaces of the materials and the interface material-dentin. Representative samples from each group are shown below.

### **MTA GRAY**

#### **Control Sample MTA Gray**



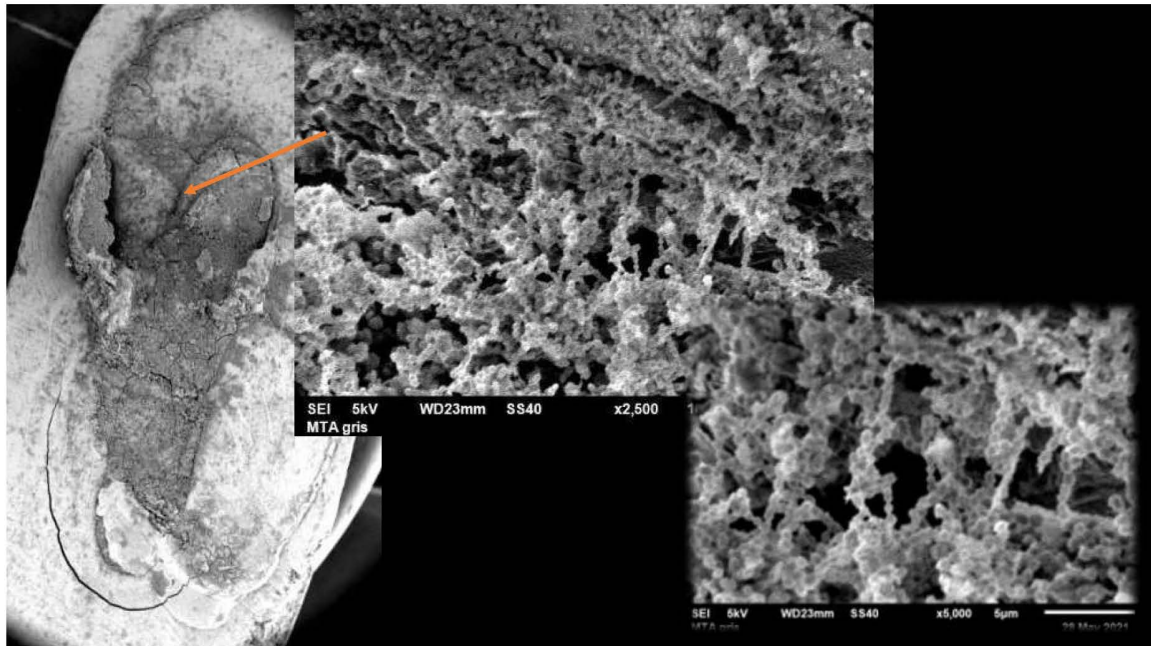
The image shows the entire dentin disc piece with MTA Gray filling material at a magnification scale of 20x at 5 kilovolts, in which different topography of the material can be identify, one smooth and the other rough; on the right side you can see the rough surface which can be differentiated with cracks that goes to the end of the surface. When making a magnification of 2500x on this surface, bulging amorphous figures with a rough and granulated surface are observed, which have a depth

*Ruiz Flores A.*

**“EVALUATION OF BIOFILM FORMATION OVER MTA AND BIODETINE SURFACE AS ROOT END FILLING MATERIAL; AN INVITRO STUDY”**

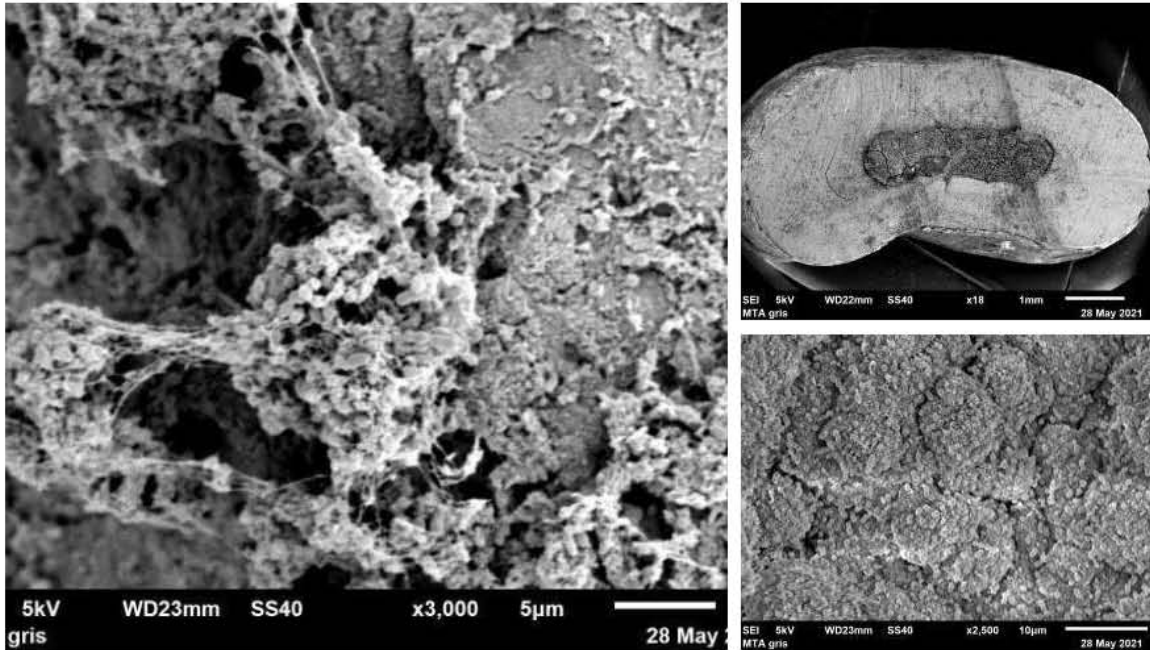
that makes the cracks that are observed at 20x, at the depth of these channels, granules can still be observed. At the same magnifications, the left side, the smooth surface, can be seen without these channels or cracks but with a uniform and constant surface. Despite these differences, the roughness and graininess are the same on both surfaces.

**Experimental sample #1 MTA Gray**



Right here in sample 1, of MTA Gris, it is observed like our negative control in a magnification of 20x, different topographies, smooth and rough, where the integration of the microorganisms with the material can already be observed. At a magnification of 2500x we can observe the different forms of cocci in colonies on the entire surface of the observed material, when we go to the interface, we can observe coccoid-shaped protrusions in networks trying to join from one side to another, in these networks at a magnification of 5000x, it can be seen how the microorganism is making a closure to create a connection between the surfaces.

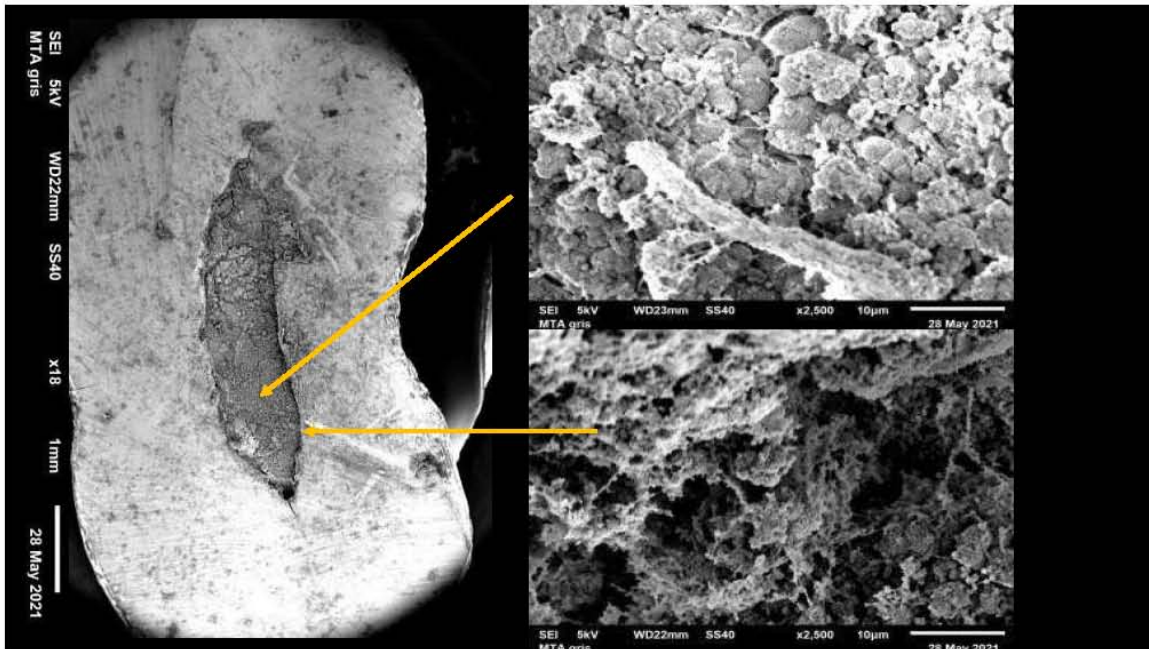
**Experimental Sample #2 MTA Gray**



In the upper right side micrography we can see the complete piece of the dentin disc with gray MTA material. On the surface of the MTA you can see different surfaces with smooth and rough aspects, just as you can find reliefs on them. All this observed under a magnification of 18x. In a magnification of 2500x on the rough surface, amorphous accumulations of solid appearance are found at unevenness in which typical structures of *E. faecalis* are appreciated, which are rounded or coccoid shape. On this same surface there are fissures in which there are settlements of the microorganism. In the image on the left side, under a magnification of 3000x on the interface of the filling material with the dentin we find agglomerations of *E. faecalis* that are found in the forms of clusters and chains surrounded by an extracellular polymer matrix, which connects with other accumulations of *E. faecalis*. Observing this extracellular polymer can indicate that there is a metabolic activity and are having a bacterial communication.

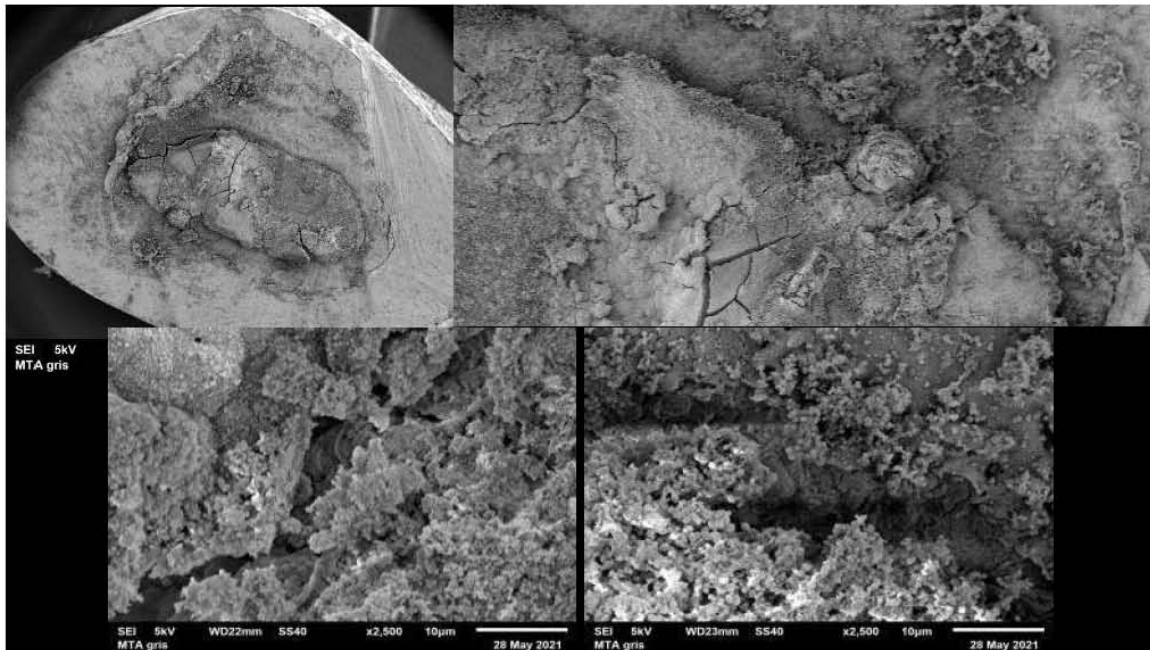


**Experimental Sample #3 MTA Gray**



The left side of the micrograph shows the entire tooth with gray MTA in the lumen of the dentin disc, the surface of the material has a rough and cracked appearance. In a magnification of this at 2500x, agglomerations of rounded accumulations full of coccoid structures and extracellular matrix filaments can be observed in this same pattern from those previously, in this micrograph the microorganisms formed an elongated multilayer structure surrounded by a matrix extracellular polymer. At the interface of the gray MTA with the dentin we see chains formed by cocci, some of which manage to form bridges between the two surfaces.

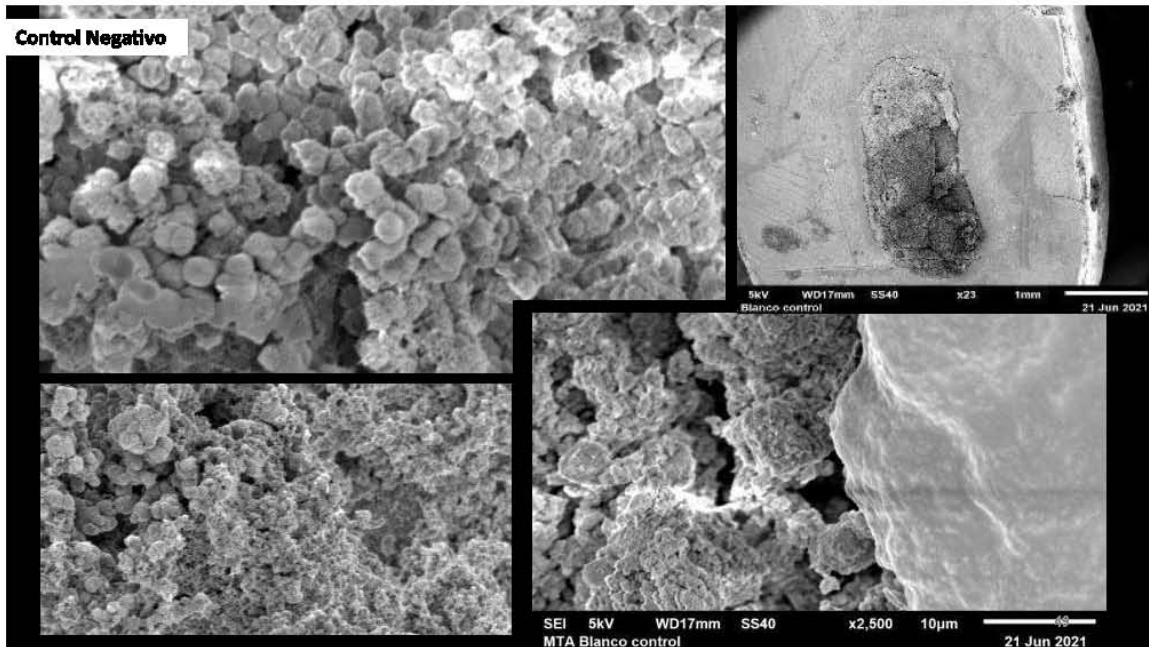
**Experimental sample #4 MTA Gray**



In the 18x image of the dentin disc found on the upper right side, the gray MTA material can be seen in the center of it, as well as in part of the dentin surface, which may have been caused by the detachment of the material during handling. On the surface of the MTA in the central part of the dentin disc, different topographies with different roughness patterns can be identified, which help the sediment of *E.faecalis*. At the 2500x magnification, interactions of microorganisms or coccoid structures with the material are observed, forming small clusters, chains and agglomerations. The same can be seen in the image on the lower left side, which corresponds to the interface of the material with the dentin, having the same pattern of chains, clusters and agglomerations.

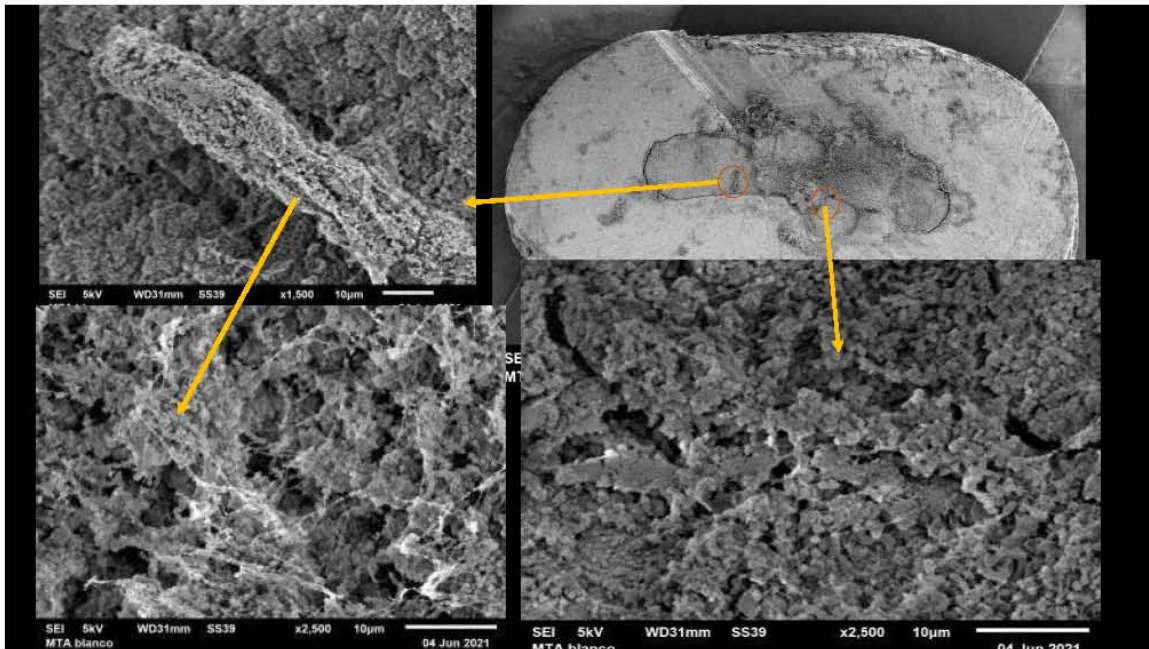
## **MTA White**

### **Control Sample MTA White**



In the SEM micrography of the White MTA Material, we can observe the control dentin disc, that can be seen on the upper right side at a magnification of 23x, the surfaces have a rough, cracked appearance and may appear smoother than others. If we expand the magnification scale to 2500x, we can see the material with an irregular pattern, with rough surfaces and with deep niches. Unlike the samples stained with *E. faecalis*, the grainy and irregular surfaces do not show any trace of an extracellular matrix.

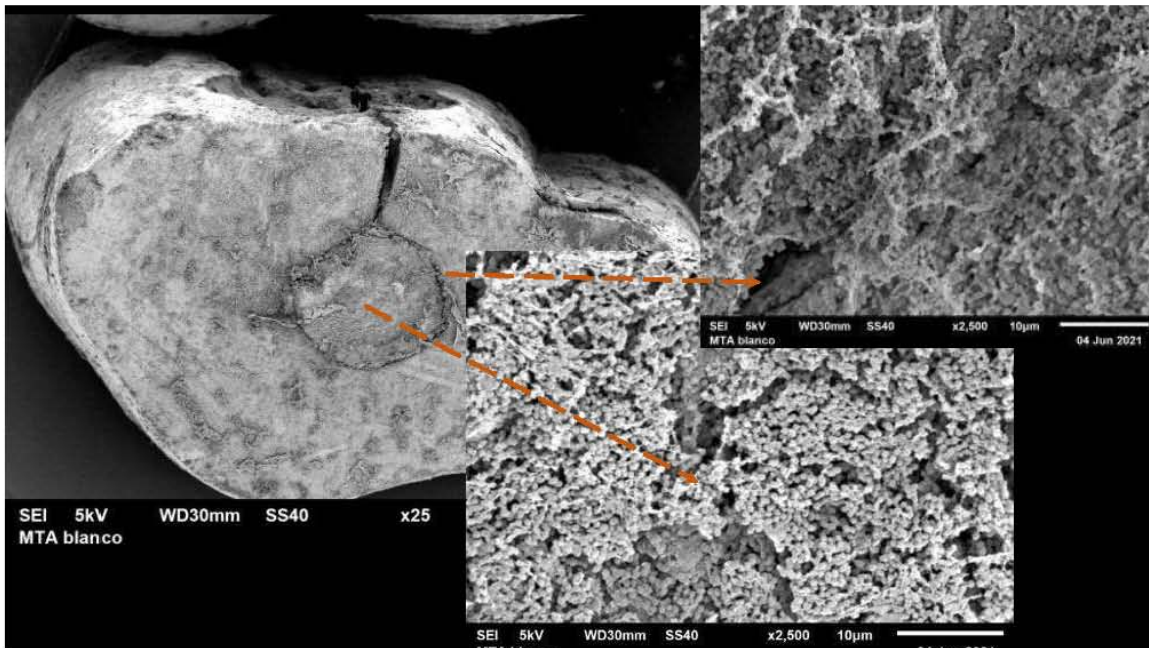
**Experimental Sample #1 MTA White**



In the micrography of the contaminated MTA White of *E.faecalis* at a magnification of 16x we can see the entire dentin disc, where different topographies of the material can be observed, which also expands or is present in part of the dentin, continuing with the variants of the topography that are smooth, rough and with relief. In the central part where the rough topography with relief is found, we can see at a magnification of 1500x, that it has small bulges with a constant pattern, being rough and with granules, but we can also find structures with longitudinal relief, which it is possible to see interlocking networks on its entire surface, with the same roughness and porosity. When carrying out a magnification at 2500x on this structure, it is seen how these networks are connected with coccoid structures that have the characteristics of *E.faecalis*, where this network can match with the characteristics of extracellular polymers. These networks with cocos can be seen throughout the surface as well as in the deeper zones with porosities or crack spaces, they can continue to be appreciated, these creates a multilayer structure of these networks. In the area of the interface of the dentin with the filling material, we can see how the surface is full of coccoid structures connected to each other, forming binary and chain alignments. A slight separation of the material with the dentin can be observed, which may be due to the colonization of bacteria and their connection from one material to another.

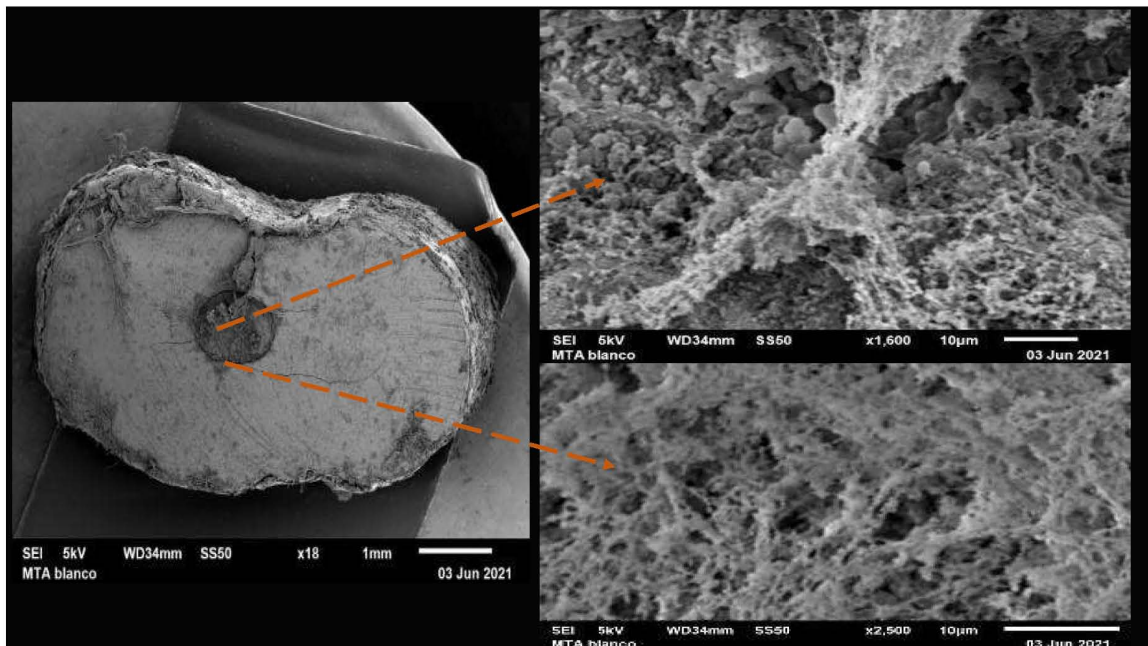
*Ruiz Flores A.*

**Experimental Sample #2 MTA White**



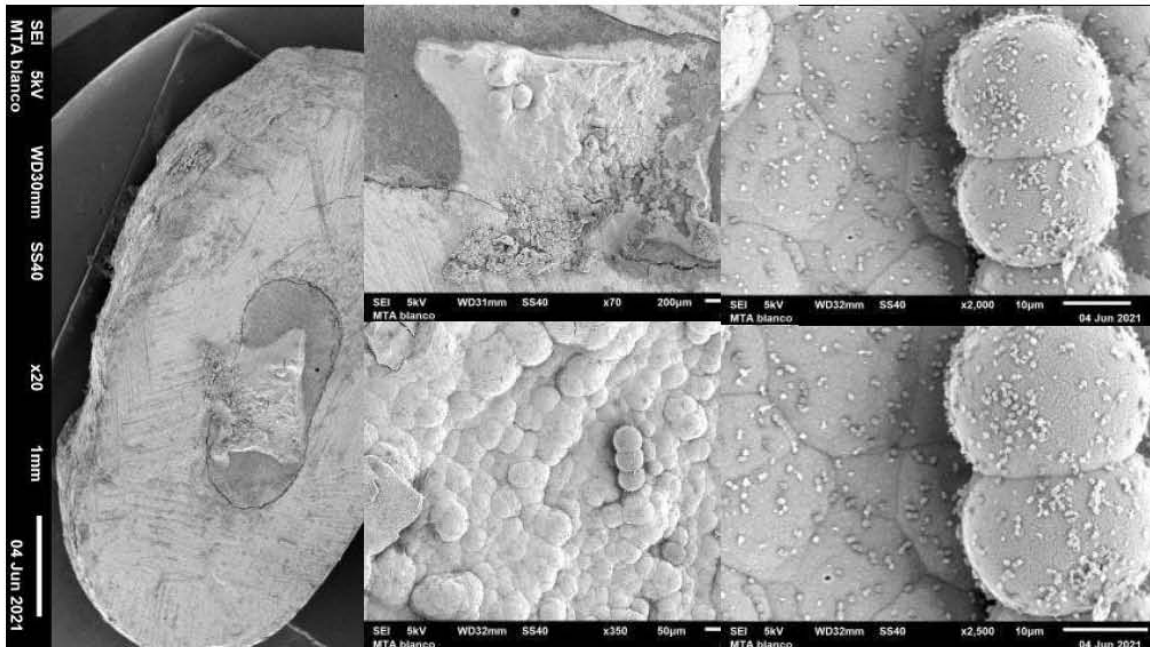
In the 25 x micrography we can see the entire piece where the MTA White filling material is located in the center, where this can also be found on the surface of the dentin, which can be detachment of the material when it comes into contact with the culture medium, the surface of the material can be seen in a uniform way with certain reliefs in the peripheral area where it has a bond with the dentin, when making a 2500x magnification on the surface of the material it is observed full of coccoid-shaped structures in clusters and in chains, at the interface at the same magnification, these clusters and chains can be observed in linear structures surrounding them, forming more complete units which coincide with a matrix of extracellular polymers, which help to create networks for the colonization and maturation of the microorganism, in the interface these networks connect one to material with another.

**Experimental Sample #3 MTA White**



In the image you can see on the left the complete dentin disc which in the center can be identified the MTA White filling material where at a magnification of 18x, an irregular topography with smooth reliefs is appreciated, on the surface of the dentin you can see you can see a regular surface with certain cracks, which are biofilm formation, since observing the periphery of the disc you can see a uniform mass with irregularities that embraces the periphery and continues on the surface of the dentin until it reaches the lumen of the disc where the filling material is located. At a magnification of 1600x on the surface of the material, we can determined the irregularities of the reliefs of the material with structured cocci, creating alliances that together create masses of networks surrounded by polymers that help these alignments of cocci to being in contact one to another, on this same structure at 2500x magnification can better be appreciate these alienations of the cocci, creating chains and networks, creating a three-dimensional structure, in the spaces or porosities of these structures you can see more coccoid shapes in the depths, giving a multilayering surface.

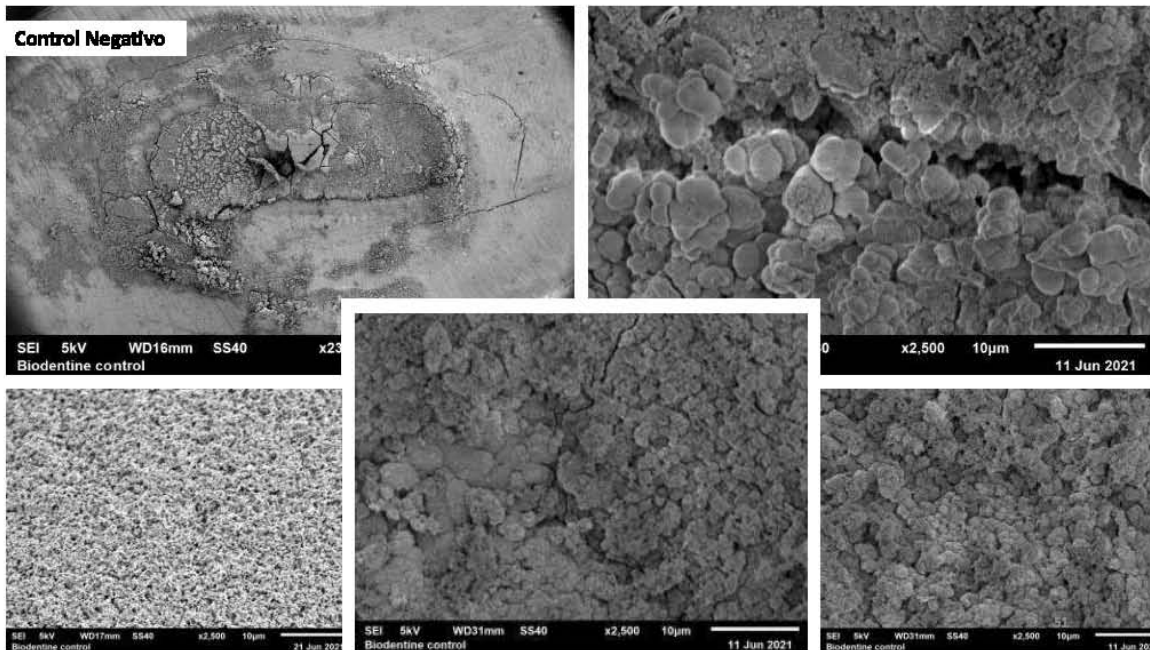
**Experimental Sample #4 MTA White**



The micrography shows the dentine disc and the material, the topography of the material surface can vary a lot, since in a 20x image, on the left side the entire dentin disc can be seen where the lumen in the center of the disc is filled with White MTA, and a surface of different coloration and with a uniform relief in the central part is observed in it, which could be material detached by the existing flow during the period or formation of mature biofilm, this surface can be observed with roughness and when magnification is done on these two surfaces of different colors, we can see different topographies, the most luminous or white being the one that has fissures, uniform reliefs and amorphous solid bulges with smooth appearance, in these bulges it is carried out a magnification at 350x to clearly observed them, in which we find this uniform surface too (area with bumps amorphous, solid and smooth in appearance). At a magnification of 2500x, we can see that the surface of these bulges is uniformly roughness's which are covered by microorganisms in a coccoid shape, where it shows how they are in duplication or in the formation of chains, thus giving the appearance of that are in development.

## Biodentine

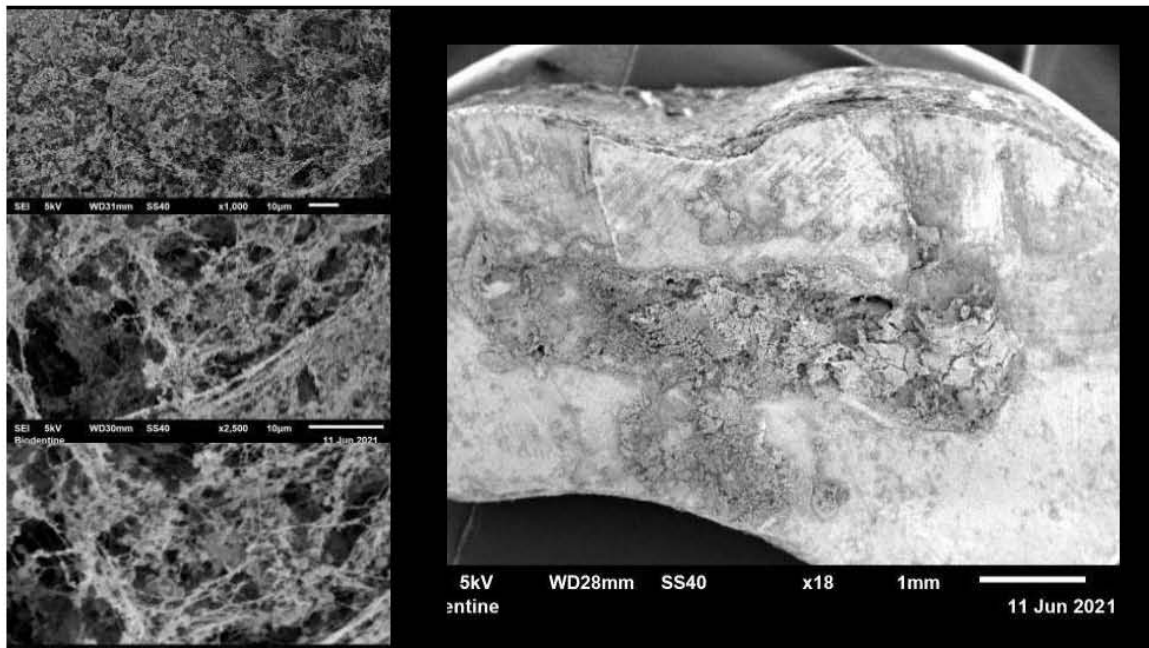
### Control Sample Biodentine



In the image of the Biodentine material in the complete dentin disc at a 23x magnification can be presented with different types of topographies, rough, smooth, uniform and with reliefs, as we observed in the dentin surface we can identify traces of the material, with the same topography. By making a magnification of the area on the different surfaces, we can see that at 2500x on a rough surface, the material is grainy, compact, and smooth. But despite these characteristics, it causes a very rough surface with microporosities. In a magnification at 2500x of the more uniform surface, we can observe the same characteristics with rough surface, but constant and uniform.

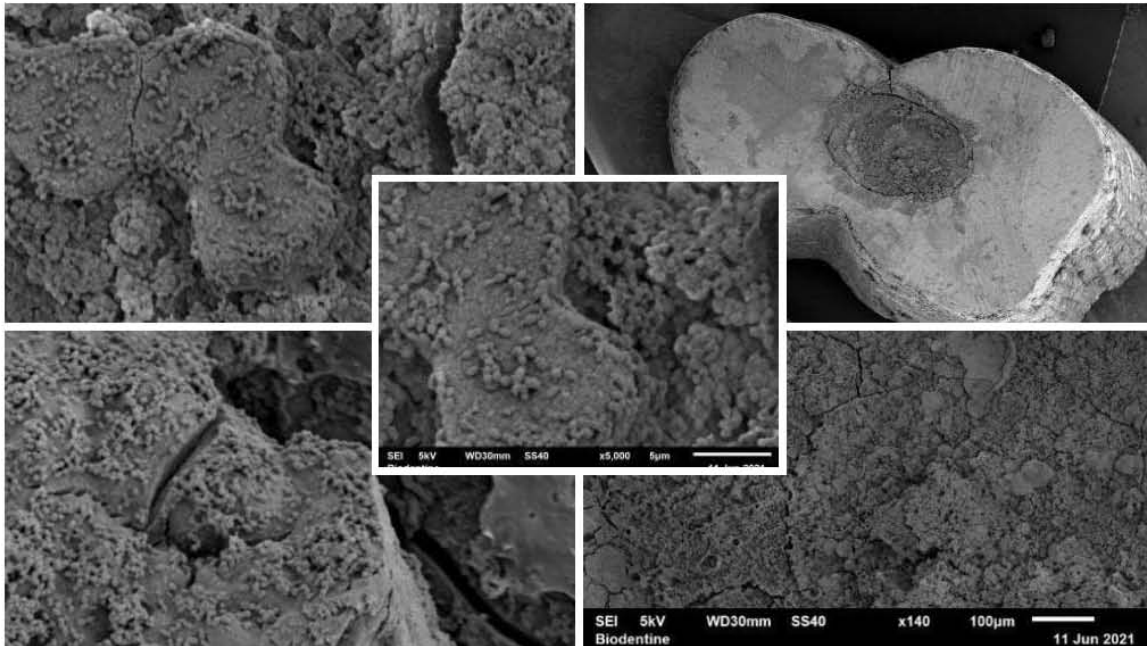


**Experimental Sample #1 Biodentine**



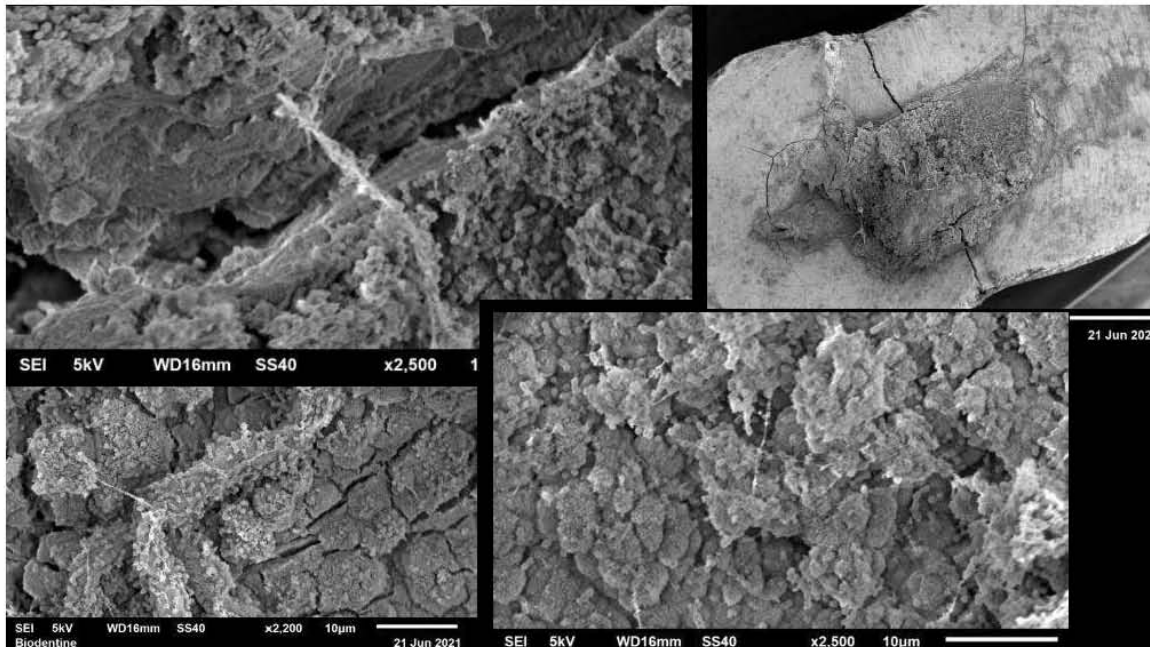
In the micrography, the part of the dentin disc with biodentine filling material is on the right side, where its surface has an irregular topography from the center to its peripheries, which it might have some of the material detachment after coming into contact with the culture medium, in a magnification of 1000x on this surface you can see a cocci networks and small amorphous roughness's that seem to form bulges of microorganisms, when performing a magnification of 2500x, we can observe the rounded shape that matches *E. faecalis* morphology excreting extracellular matrix polymers which are observed as whitish thin-structured filaments surrounded or embedded by more coccoid structures that create these networks between groups of bacteria, which could be said to be uniting to form a more solid and stable biofilm structure, this helps their communication and organization for their development.

**Experimental Sample #2 Biodentine**



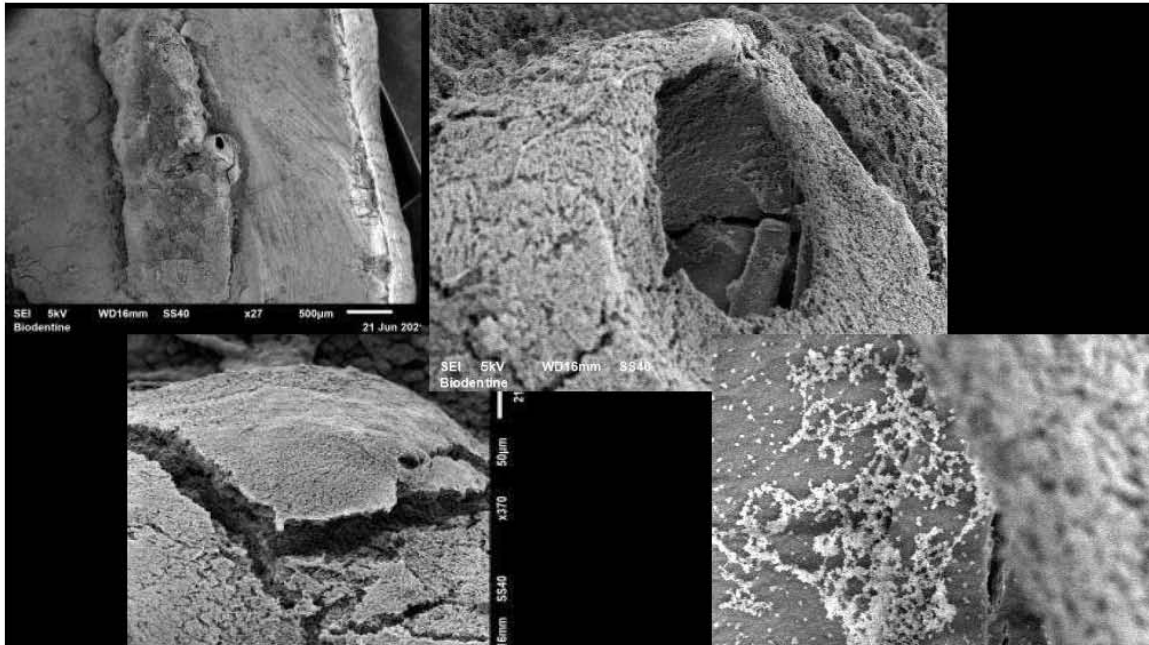
In the following sample you can see the piece of the dentin disc with Biodentine obturation material in which the surface is rough and irregular, in the irregularities a 140x magnification can be better appreciated how the topography of the material consists of a homogeneous surface, with porosities and cracks on the surface, which may have reliefs in which another approach is made at 2500x, and you can see an 8-shape of material which is full of microorganisms that if we observed with detail, it can be seen how these are in the division phase which consists or can be on colonization phase, just as these are observed in a chain, which the literature mentions that this can be part of a short link communication, or simply a structural organization for its adherence to the surface and colonization. At the interface at a magnification of 2500x, it can be observed that there are microorganisms in the material and the dentin, but an intimate connection between the materials is not appreciated, since the division by a canal can be assessed. In this channel at depth of it, shows coccoid microorganisms but without any extracellular matrix filament.

**Experimental Sample #3 Biodentine**



In the micrography at a 20x scale, the complete dentin piece can be seen where the Biodentine filling material is in the center of it, with an irregular and raised surface with relief, which has a cracked appearance. As in its surroundings, can be observed the surface of the dentin and biodentine material that possibly was detached from it when it came into contact with the culture medium. At a magnification of 2500x can be determined cracked aspect of the relief, creating amorphous bacterial agglomerations that are compact and with a solid appearance. In the interface of the material with the dentin at 2500x magnification, which is the upper left image, it can be seen how there is a separation between the material and the dentin, but despite this a chain of microorganisms with extracellular polymer filaments trying to create a connection between them.

#### Experimental Sample #4 Biodentine



In this experimental sample of Biodentine it is possible to observe at 20x of magnification the entire dentin disc, with an irregular rough relief that is on the entire surface of the material, creating a crater too. When magnifying it at 450x, it is possible to observe in the periphery how a multilayer biofilm is formed with rounded and porous structures, which at a magnification at 2000x, can be identify the coco structure of *E.faecalis* giving it a multilayer colonies creating a solid structure, with the creations of chains, clusters and networks with extracellular polymers. At the depth of the crater structure, we can still identify the typical structure of the microorganism that is studied and confirms the multilayering biofilm that *E. faecalis* creates.

\*\*\* See Annex 1 where all the lectures on SEM of the experimental groups are found, having a similar pattern in the growth of biofilm, in the three surfaces of the filling materials these patterns can be identified.

## Discussion

Within endodontic treatments, apical surgery or apicectomy aims to reduce or eliminate persistent bacterial invasion, as well as its products, in the root canal and the external portion of the root. Bacterial colonization is an active process, in which it is carried out by a polymicrobial group in constant communication and development. The facultative anaerobic microorganisms are the most frequent in persistent infections, *E. faecalis* is one of the principal microorganisms found on these infections. Due to its ability to survive, adherence to surfaces (serine, protease and collagen-binding protein) and biofilm formation, this is found between 24-77% in isolated cultures of a failed endodontic treatment. (Beltran-Leal et al., 2020; Song, Kim, Lee, Kim, & Kim, 2013; Tsesis et al., 2017)

Over time modifications in dental materials have been done, giving them properties and characteristics based on the needs of the patients and dentists. Today bioceramics are the number one choice in apical surgery for having characteristics such as greater biocompatibility with vital tissues, dental pulp, cement, dentin, periodontium, bone tissue, etc. Bioceramic materials induce a positive biological response in the host, where they increase the sealing and prevent communication between peri-root tissues with the interior of the tooth. (Trujillo-hernández, Flores-ventura, & Msc, 2019) Recurrent chronic infections in the root canals have as their main etiology the persistence of microorganisms in the canal system or the peri-radicular tissues, causing a chronic inflammation, causing pain, with signs and symptoms characteristic from the pathology. The treatment of choice is apical surgery after endodontic reintervention has been performed. Once the surgery and apical resection have been performed, the exposed root portion must be sealed for the success of the treatment, bioceramics obturation materials are the election option since it has been seen a biological and antimicrobial response, the 5-year success of these materials has been reported up to 86.4-95.6% (Abusrewil, McLean, & Scott, 2018)(Bhavana et al., 2015)

Bioceramic materials having reparative and cell induction characteristics, and being in close relationship with tissues, have been studied to see their behavior in contact with different substances and environments how it could change its mechanical, chemical and bioactive characteristics. *Agraffioti et al.* carried out a study in which the objective was to evaluate the microstructure acquired after exposing MTA and Biodentine to different solutions: saline solution and citric acid with a pH of 5.4 for three months and how it affected the sealing. The results were

modifications in the microstructure in both materials, but MTA was the one that presented less changes in acidic environments, but without having a significant difference. *Trujillo et al*, also evaluated the structural changing and the production of apatites when in contact with PBS which is a phosphate buffered saline solution, and it was found morphological changes and precipitation of apatite on the material, where it formed different morphological structures on the surface of the materials. In our research we did not evaluate the structure of the surfaces of the materials, but by observing the controls we can see that if there is a modification in the structure of the materials when in contact with a BHI culture medium (Brain-Heart Infusion), creating precipitates, with protrusions of the same material, detachment of this and observing porosities and roughness on the surface in different patterns. These uneven and rough surfaces serve as niches for the precipitation of microorganisms and facilitate the formation of a biofilm. (Agrafioti et al., 2016; Trujillo-hernández et al., 2019)

In the root system, it has been seen that bacteria suffer from a deprivation of nutrients which helps to activate an efficient adaptive response, causing regulatory reactions to change their metabolic balance of biosynthesis and reproduction, acquiring their own metabolic energy for the existing biological function. Creating a latent state, in which they can remain alive, without being in reproductive function, this phenomenon has been observed in studies where from 100% of the bacteria that undergo this process 75% -80% remain alive, this state is called viable non-cultivable. *Shen et al* conducted a study where they placed anaerobic bacteria under nutritional stress and saw the growth of biofilm, where they saw that these could grow up to 30-100 micrometers wide in biofilm. Our study agrees, since although the thickness is not known exactly, we can see that the surface of the material and the dentin are full of the microorganism, and that if we make an approach to the cracks or deeper surfaces we can observe how the typical coccoid shape is observed embedded on these surfaces, as well as "smooth" surfaces, and deduce that it is the typical pedunculated shape with a vertical height, which is said to have the appearance of "mushroom" made up of multilayers of millions of cocci, forming a mature biofilm / biofilm. (Shen, Stojicic, & Haapasalo, 2010)

*Bhavana et al.*, made a study in which different materials such as Biodentine, MTA and glass ionomer were placed in contact with different microorganisms, both bacteria (*S. mutans*, *E. faecalis*, *E. coli*) and fungi (*Candida Albicans*), have an interaction with the materials and was observed that

Biodentine had higher values against the microorganism than MTA and glass ionomer, but without having a significant difference with MTA. Biodentine and MTA managed to have a favorable response against *E. faecalis*. (Bhavana et al., 2015) While *Estrela et al. and Kim et al* had different results where MTA did not observe antimicrobial activity against *E. faecalis*. In this study agreed with them, because all the surfaces of the materials studied, the interface and on the surface of the material, biofilm was found. (Estrela et al., 2018; Islam et al., 2006; R. J. Y. Kim, Kim, Lee, Lee, & Shin, 2015; Zancan et al., 2019)

The main difference between gray and white MTA is the decrease or absence of iron oxide that forms a tetracalciummalumino-ferrite phase. As mentioned before, the handling of the material, in terms of liquid-powder ratios, mixing times, solidification time, etc. may alter the physical and chemical properties of these, so *Khalid AL-Hezaimi et al.* in their study compared the different proportions of both MTA for the elimination or reduction of microorganisms, where it was observed that for *E. faecalis* in concentrations of 50, 25 and 12.5 mg / ml of MTA gray, do not have bacterial growth in any of the time periods tested (24, 48 and 72 hours); but white MTA bacterial growth was found at all concentrations and time periods evaluated. In our study, the liquid powder ratio indicated by the company was used, and despite the concentration used both surfaces MTA White and MTA Gray were found with biofilm formation (Al-Hezaimi, Naghshbandi, Oglesby, Simon, & Rotstein, 2006; Kaur et al., 2017)

Biodentine is a silicate-based material that was introduced in 2010 as a dentine substitute, because exhibits similar mechanical and physical properties to dentin. Both materials Biodentine and MTA have biocompatibility and cell induction characteristics, their antimicrobial and antifungal properties have been studied which have had a good response, these properties are attributed to the ability to release calcium ions, enhancing its ability to create alkaline environments. *Hiremath et al* conducted a study in which they evaluated and verified the antimicrobial efficacy of Biodentine and MTA, in which no significant antifungal differences (*Candida*) were observed, but *against E. faecalis*, Biodentine had a better inhibitory response at different times than MTA. *Bhavana et al* also evaluated the inhibitory response of different materials with different microorganisms, *Streptococcus mutans, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, and Candida albicans*, in which they concluded that Biodentine had the best inhibitory response before these microorganisms compared to materials such as the MTA and Glass Ionomer, clarifying that it did not eliminate them but simply inhibited them. (Abusrewil et al., 2018; Bhavana et al., 2015; Hiremath et al., 2015)

In our study, the three materials presented the presence of microorganisms on their surfaces, in which we can find the different stages of biofilm formation, which consists of 1) adherence of microorganisms to surfaces, 2) microcolonization or formation of colonies, 3) biofilm maturation, and 4) growth, dispersion and shedding of microorganisms. Despite the different stages found, different growth patterns can be identified in which the typical forms of enterococci can be seen in all of these, which are rounded with a minimum elongation, giving a coccoid shape, where it agrees with the research of *Santos et al*, its characterization begins with the coating of the areas with the microorganisms, where the evaluated surfaces are full of coccoid structures, and can be individually, in a chain or clusters, where extracellular polymer networks are observed forming microcolonies, and finally forming patterns that have smoother surfaces but with coccoid structures still visible, all this was observed in different periods of time 24h, 36h, 72h, 192 and 360 h, although we saw all these patterns after 21 days agreeing with the description of his research, confirming the presence of biofilm on the surfaces of the different filling materials used(Santos et al., 2008)

*George et al.* carried out a study in which they evaluate the biofilm formation of *E.faecalis* with two different environmental conditions, one with a nourished culture medium and the other under nutritional stress at 21 days, which in our study we used the first one mentioned. In the description of this formation, he mentions that the mature structures formed by nutritional stress are more dispersed than in a nourished environment, since there is not such a marked form of "mushroom", which consists of a bulge or conglomeration of smooth and solid appearance where you can find microorganisms channels for their nutrition, in their study they found that a "mature" biofilm with nutritional stress is only seen as groups of bacteria, which in our study we found the two types structures of mature biofilm mentioned, of "mushroom " and dispersal bacterial groups. As well as agrees that keeping a microorganism under nutritional stress or nourish environments does not affect the growth and formation of biofilm(George, Kishen, & Song, 2005)



## **Conclusions**

Bioceramics materials despite the antimicrobial properties attributed to it, have characteristics that help the formation of biofilm. Since they present asymmetric and rough surfaces that make the settlement and adhesion easier for the microorganism and favorable for their reproduction. The lectures in the scanning electron microscope show us how there are structures of coccoid morphology, which are found in clusters, chains, and agglomerations, surrounded by a matrix of extracellular polymers which confirm the metabolic activity of the microorganism, this was observed in the three materials studied, MTA Gray, MTA White and Biodentine, and it was identify in all of them the phases of biofilm formation.

Nowadays microorganisms have evolved and created adaptation mechanisms which help their survival and development, that is why it is important that in any treatment that has a persistent infection or existence of pathogenic microorganisms, the cleaning and disinfection protocol carried out is what will guarantee the success of our treatments.

## **Perspectives**

**The present work leaves the following perspectives:**

- **Increase the number of samples.**
- **Extend evaluation times.**
- **UFC counting**
- **Formation of a polymicrobial Biofilm on the surfaces of the materials.**
- **Evaluate different Bioceramic materials.**
- **Perform atomic force microscope readings.**

## **Bibliography**

- About, I. (2016). Biodentine: dalle proprietà biochimiche e bioattive alle applicazioni cliniche. *Giornale Italiano Di Endodonzia*, 30(2), 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.gien.2016.09.002>
- Abusrewil, S. M., McLean, W., & Scott, J. A. (2018). The use of Bioceramics as root-end filling materials in periradicular surgery: A literature review. *Saudi Dental Journal*, 30(4), 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2018.07.004>
- Agrafioti, A., Tzimpoulas, N., Chatzitheodoridis, E., & Kontakiotis, E. G. (2016). Comparative evaluation of sealing ability and microstructure of MTA and Biodentine after exposure to different environments. *Clinical Oral Investigations*, 20(7). <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1638-6>
- Al-Hezaimi, K., Naghshbandi, J., Oglesby, S., Simon, J. H. S., & Rotstein, I. (2006). Comparison of antifungal activity of white-colored and gray-colored mineral trioxide aggregate (MTA) at similar concentrations against *Candida albicans*. *Journal of Endodontics*, 32(4), 365–367. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.08.014>
- Beltran-Leal, A., Muñoz-Ruiz, A., Esparza-Villalpando, V., Castro, Y., Pozos-Guillen, A., & Flores, H. (2020). 5-Aminolevulinic Acid Photoactivated Over Planktonic and Biofilm Forms of *Enterococcus Faecalis* As a Pharmacological Therapy Alternative. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56, 1–9. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000318544>
- Bhavana, V., Chaitanya, K. P., Gandi, P., Patil, J., Dola, B., & Reddy, R. B. (2015). Evaluation of antibacterial and antifungal activity of new calcium-based cement (Biodentine) compared to MTA and glass ionomer cement. *Journal of Conservative Dentistry*, 18(1), 44–46. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.148892>
- Borges, A. H., Pedro, F. L. M., Semanoff-Segundo, A., Miranda, C. E. S., Pécora, J. D., & Cruz Filho, A. M. (2011). Radiopacity evaluation of Portland and MTA-based cements by digital radiographic system. *Journal of Applied Oral Science*, 19(3), 228–232. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572011000300009>
- Cerra, H., Aversa, N., Carbone, N., Carnevali, S., Chiesa, C., Covo, M., ... Zaresky, A. (2013). *Manual de Microbiología aplicada a las Industrias Farmacéutica, Cosmética y de Productos Médicos*.
- Coriell, L. L., & McGarrity, G. J. (1970). Evaluation of the Edgegard laminar flow hood. *Applied Microbiology*, 20(3), 474–479. <https://doi.org/10.1128/aem.20.3.474-479.1970>
- de Paz, L. C. (2007). Redefining the Persistent Infection in Root Canals: Possible Role of Biofilm

- Communities. *Journal of Endodontics*, 33(6), 652–662.  
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.11.004>
- de Vasconcelos, B. C., Bernardes, R. A., Cruz, S. M. L., Duarte, M. A. H., de Magalhães Padilha, P., Bernardineli, N., ... de Moraes, I. G. (2009). Evaluation of pH and calcium ion release of new root-end filling materials. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 108(1), 135–139. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.02.026>
- Duarte, M. A. H., Marciano, M. A., Vivan, R. R., Tanomaru-Filho, M., Guerreiro-Tanomaru, J. M., & Camilleri, J. (2018). Tricalcium silicate-based cements: properties and modifications, 32, 111–118. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0070>
- Eraković, M., Duka, M., Bekić, M., Tomić, S., Ismaili, B., Vučević, D., & Čolić, M. (2020). Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of Biodentine on human periapical lesion cells in culture. *International Endodontic Journal*, 53(10), 1398–1412. <https://doi.org/10.1111/iej.13351>
- Estrela, C., Decurcio, D. de A., Rossi-Fedele, G., Silva, J. A., Guedes, O. A., & Borges, Á. H. (2018). Root perforations: A review of diagnosis, prognosis and materials. *Brazilian Oral Research*, 32, 133–146. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0073>
- Fischer, E. R., Hansen, B. T., Nair, V., Hoyt, F. H., & Dorward, D. W. (2012). *Scanning electron microscopy. Current Protocols in Microbiology*. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc02b02s25>
- George, S., Kishen, A., & Song, K. P. (2005). The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*, 31(12), 867–872. <https://doi.org/10.1097/01.don.0000164855.98346.fc>
- Grech, L., Mallia, B., & Camilleri, J. (2013). Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dental Materials*, 29(2), e20–e28. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.11.007>
- Guerreiro-Tanomaru, J. M., Trindade-Junior, A., Cesar Costa, B., Da Silva, G. F., Drullis Cifali, L., Basso Bernardi, M. I., & Tanomaru-Filho, M. (2014). Effect of Zirconium Oxide and Zinc Oxide Nanoparticles on Physicochemical Properties and Antibiofilm Activity of a Calcium Silicate-Based Material. *Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/975213>
- Guneser, M. B., Akbulut, M. B., & Eldeniz, A. U. (2013). Effect of various endodontic irrigants on the push-out bond strength of biodentine and conventional root perforation repair materials. *Journal of Endodontics*, 39(3), 380–384. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.11.033>

- Hachmeister, D. R., Schindler, W. G., Walker, W. A., & Thomas, D. D. (2002). The sealing ability and retention characteristics of mineral trioxide aggregate in a model of apexification. *Journal of Endodontics*, *28*(5), 386–390. <https://doi.org/10.1097/00004770-200205000-00010>
- Hayes, T. L., & Pease, R. F. (1968). *The scanning electron microscope: principles and applications in biology and medicine. Advances in biological and medical physics* (Vol. 12). ACADEMIC PRESS, INC. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4831-9928-3.50006-0>
- Hiremath, G. S., Kulkarni, R. D., & Naik, B. D. (2015). Evaluation of minimal inhibitory concentration of two new materials using tube dilution method: An in vitro study. *Journal of Conservative Dentistry*, *18*(2), 159–162. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.153056>
- Islam, I., Kheng Chng, H., & Jin Yap, A. U. (2006). Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement. *Journal of Endodontics*, *32*(3), 193–197. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.043>
- Kaur, M., Singh, H., Dhillon, J. S., Batra, M., & Saini, M. (2017). MTA versus biodentine: Review of literature with a comparative analysis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, *11*(8), ZG01–ZG05. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/25840.10374>
- Khan, A. S., & Syed, M. R. (2019). A review of bioceramics-based dental restorative materials. *Dental Materials Journal*, *38*(2), 163–176. <https://doi.org/10.4012/dmj.2018-039>
- Kim, R. J. Y., Kim, M. O., Lee, K. S., Lee, D. Y., & Shin, J. H. (2015). An in vitro evaluation of the antibacterial properties of three mineral trioxide aggregate (MTA) against five oral bacteria. *Archives of Oral Biology*, *60*(10), 1497–1502. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.07.014>
- Kim, S., & Kratchman, S. (2006). Modern Endodontic Surgery Concepts and Practice: A Review. *Journal of Endodontics*, *32*(7), 601–623. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.12.010>
- Levin, L. G., Law, A. S., Holland, G. R., Abbott, P. V., & Roda, R. S. (2009). Identify and Define All Diagnostic Terms for Pulpal Health and Disease States. *Journal of Endodontics*, *35*(12), 1645–1657. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.032>
- Manterola, C., Quiroz, G., Salazar, P., & García, N. (2019). Metodología de los tipos y diseños de estudio más frecuentemente utilizados en investigación clínica. *Revista Médica Clínica Las Condes*, *30*(1), 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2018.11.005>
- Maurício, R., Dias, C. J., Jubilado, N., & Santana, F. (2013). Biofilm thickness measurement using an ultrasound method in a liquid phase. *Environmental Monitoring and Assessment*, *185*(10), 8125–8133. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3160-0>

- Nguyen, J. N. T., & Harbison, A. M. (2017). Scanning electron microscopy sample preparation and imaging. *Methods in Molecular Biology*, 1606, 71–84. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6990-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6990-6_5)
- Pannkuk, T. F. (2011). A new technique for nonsurgical retreatment of teeth with amalgam root end fillings: Case series. *Journal of Endodontics*, 37(3), 414–419. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.11.023>
- Parirokh, M., & Torabinejad, M. (2010a). Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review-Part I: Chemical, Physical, and Antibacterial Properties. *Journal of Endodontics*, 36(1), 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.006>
- Parirokh, M., & Torabinejad, M. (2010b). Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review-Part I: Chemical, Physical, and Antibacterial Properties. *Journal of Endodontics*, 36(1), 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.006>
- Pérez, C. M. R. (2016). Cultivo y crecimiento de los microorganismos, (December 2015), 45–54.
- Provenzano, J. C., Antunes, H. S., Alves, F. R. F., Rôças, I. N., Alves, W. S., Silva, M. R. S., & Siqueira, J. F. (2016). Host-Bacterial Interactions in Post-treatment Apical Periodontitis: A Metaproteome Analysis. *Journal of Endodontics*, 42(6), 880–885. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.02.013>
- Rajasekharan, S., Martens, L. C., Cauwels, R. G. E. C., & Verbeeck, R. M. H. (2014). Biodentine™ material characteristics and clinical applications: A review of the literature. *European Archives of Paediatric Dentistry*, 15(3), 147–158. <https://doi.org/10.1007/s40368-014-0114-3>
- Santos, R. P., Arruda, T. T. P., Carvalho, C. B. M., Carneiro, V. A., Braga, L. Q. V., Teixeira, E. H., ... Freire, V. N. (2008). Correlation between enterococcus faecalis biofilms development stage and quantitative surface roughness using atomic force microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, 14(2), 150–158. <https://doi.org/10.1017/S1431927608080227>
- Sharifi, R., Araghid, A., Ghanem, S., & Fatahi, A. (2015). Effect of temperature on the setting time of Mineral Trioxide Aggregate (MTA). *Journal of Medicine and Life*, 8(Spec Iss 2), 88–91.
- Shen, Y., Stojicic, S., & Haapasalo, M. (2010). Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: Comparison of viability staining and direct culture. *Journal of Endodontics*, 36(11), 1820–1823. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.08.029>
- Signoretti, F. G. C., Endo, M. S., Gomes, B. P. F. A., Montagner, F., Tosello, F. B., & Jacinto, R. C. (2011). Persistent extraradicular infection in root-filled asymptomatic human tooth: Scanning electron microscopic analysis and microbial investigation after apical microsurgery. *Journal of*

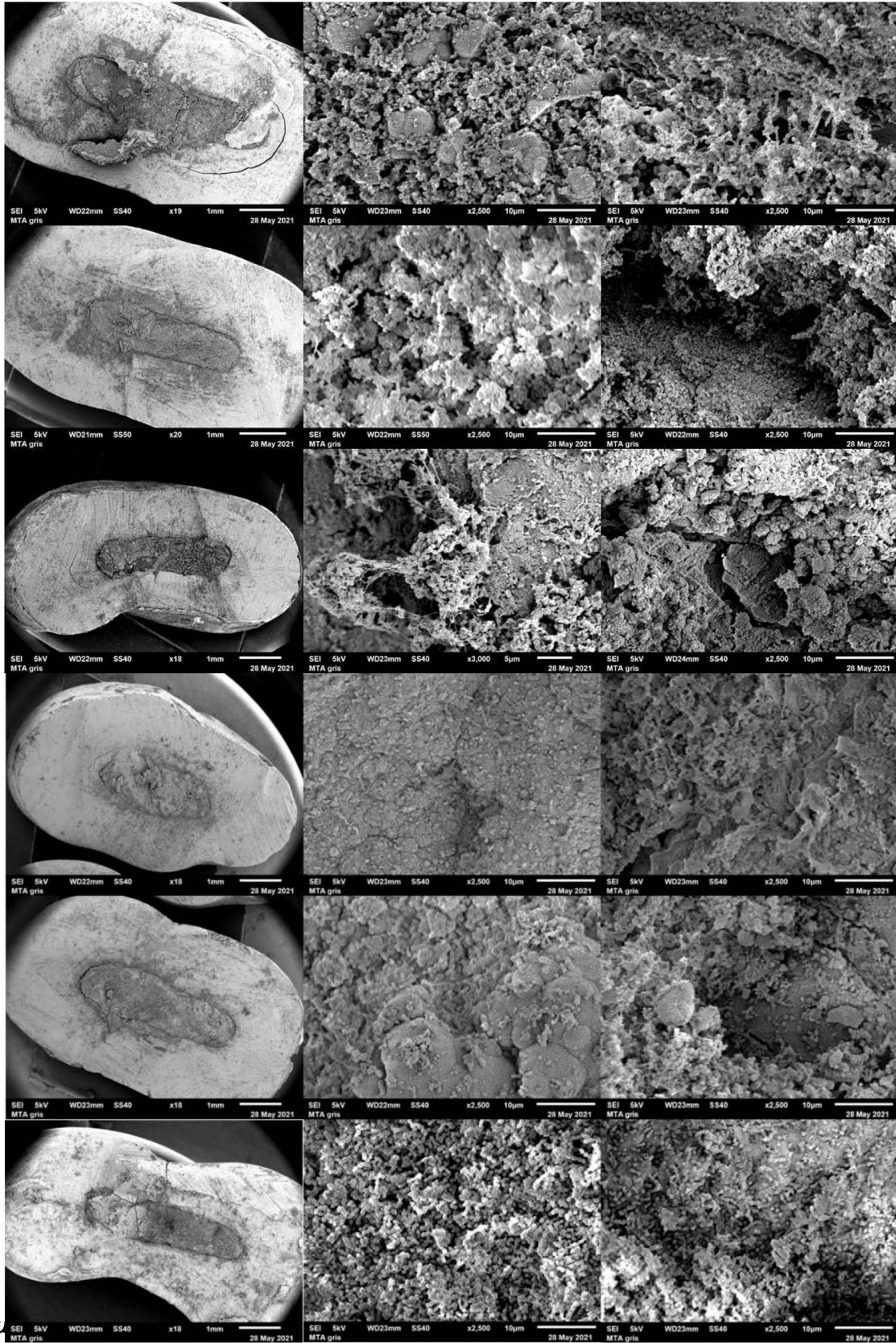
- Endodontics*, 37(12), 1696–1700. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.09.018>
- Song, M., Kim, S. G., Lee, S. J., Kim, B., & Kim, E. (2013). Prognostic factors of clinical outcomes in endodontic microsurgery: A prospective study. *Journal of Endodontics*, 39(12), 1491–1497. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.08.026>
- Souto, R., & Colombo, A. P. V. (2008). Prevalence of Enterococcus faecalis in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Archives of Oral Biology*, 53(2), 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.08.004>
- Stuart, C. H., Schwartz, S. A., Beeson, T. J., & Owatz, C. B. (2006). Enterococcus faecalis: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of Endodontics*, 32(2), 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.049>
- Subramanyam, D., & Vasantharajan, M. (2017). Effect of oral tissue fluids on compressive strength of MTA and biodentine: An in vitro study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11(4), ZC94–ZC96. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/24510.9722>
- Tamagnini, L. M., & Paraje, M. G. (2015). ¿ Qué son las bacterias viables no cultivables ? *Revista FCEFyN*, 2(2), 2013–2016.
- Tolker-nielsen, T. I. M. (2015). Bio fi lm Development, 1–12. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec>
- Torabinejad, M., Hong, C. U., McDonald, F., & Ford, T. R. P. (1995). Physical and Chemical Properties of a New Root-End Filling Material. *Journal of Endodontics*, 21(7), 349–353.
- Torres, F. F. E., Guerreiro-Tanomaru, J. M., Bosso-Martelo, R., Chavez-Andrade, G. M., & Tanomaru Filho, M. (2018). Solubility, porosity and fluid uptake of calcium silicate-based cements. *Journal of Applied Oral Science : Revista FOB*, 26, e20170465. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2017-0465>
- Trujillo-hernández, M., Flores-ventura, R. E., & Msc, A. S. (2019). Estudio comparativo de la bioactividad de dos materiales biocerámicos Comparative Study of the Bioactivity of Two Bioceramic Materials. *ODOVTOS-International Journal of Dental Sciences*, 2(21), 73–81.
- Tsesis, I., Elbahary, S., Venezia, N. B., & Rosen, E. (2017). Bacterial colonization in the apical part of extracted human teeth following root-end resection and filling: a confocal laser scanning microscopy study. *Clinical Oral Investigations*, 22(1), 267–274. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2107-1>
- Walker, M. P., Diliberto, A., & Lee, C. (2006). Effect of setting conditions on mineral trioxide aggregate flexural strength. *Journal of Endodontics*, 32(4), 334–336. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.09.012>

- Wang, J., Jiang, Y., Chen, W., Zhu, C., & Liang, J. (2012). Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. *Journal of Endodontics*, *38*(7), 954–959. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.03.004>
- Willems, H. M., Xu, Z., & Peters, B. M. (2016). Polymicrobial Biofilm Studies: from Basic Science to Biofilm Control. *Current Oral Health Reports*, *3*(1), 36–44. <https://doi.org/10.1007/s40496-016-0078-y>
- Zancan, R. F., Calefi, P. H. S., Borges, M. M. B., Lopes, M. R. M., de Andrade, F. B., Vivan, R. R., & Duarte, M. A. H. (2019). Antimicrobial activity of intracanal medications against both *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* biofilm. *Microscopy Research and Technique*, *82*(5), 494–500. <https://doi.org/10.1002/jemt.23192>
- Zhang, S., Wang, Q. Q., Zhang, C. F., & Soo, I. (2010). Identification of dominant pathogens in periapical lesions associated with persistent apical periodontitis. *The Chinese Journal of Dental Research*, *13*(2), 115–121.

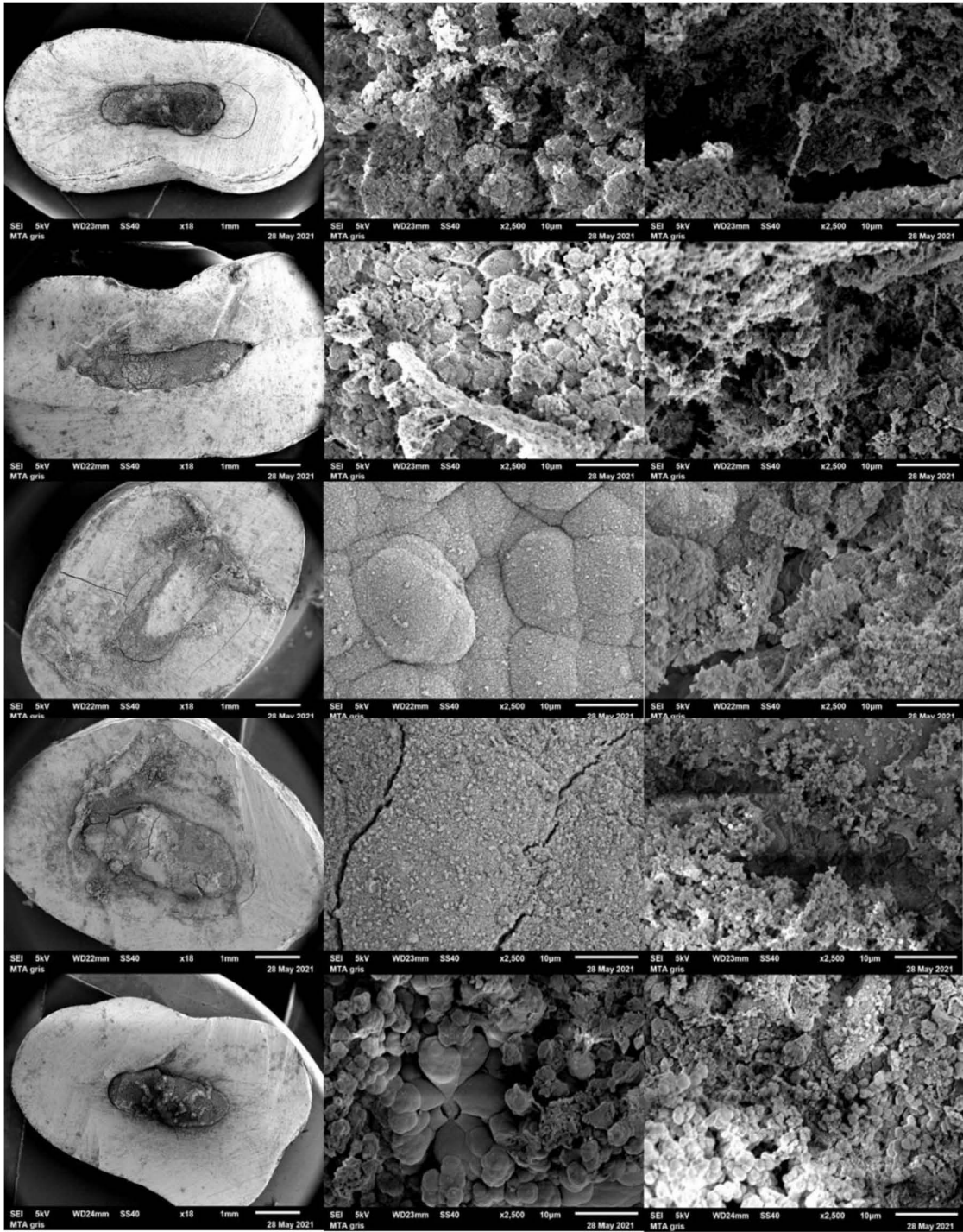


## ANEX 1

### Grup#1: MTA GRIS



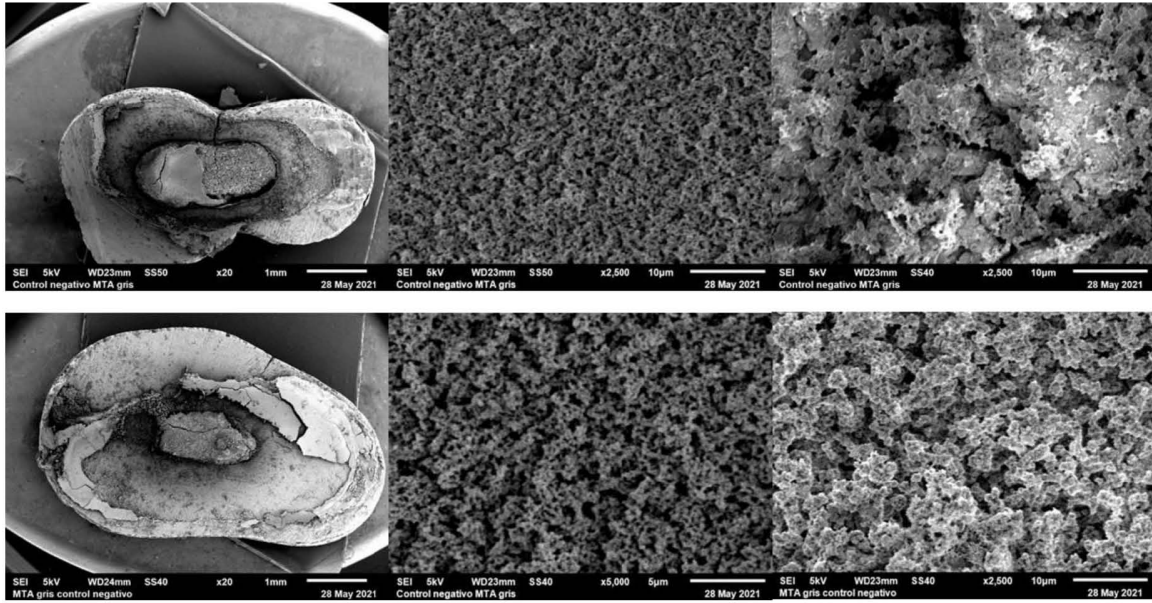
**"EVALUATION OF BIOFILM FORMATION OVER MTA AND BIODETINE SURFACE AS ROOT END FILLING MATERIAL; AN INVITRO STUDY"**



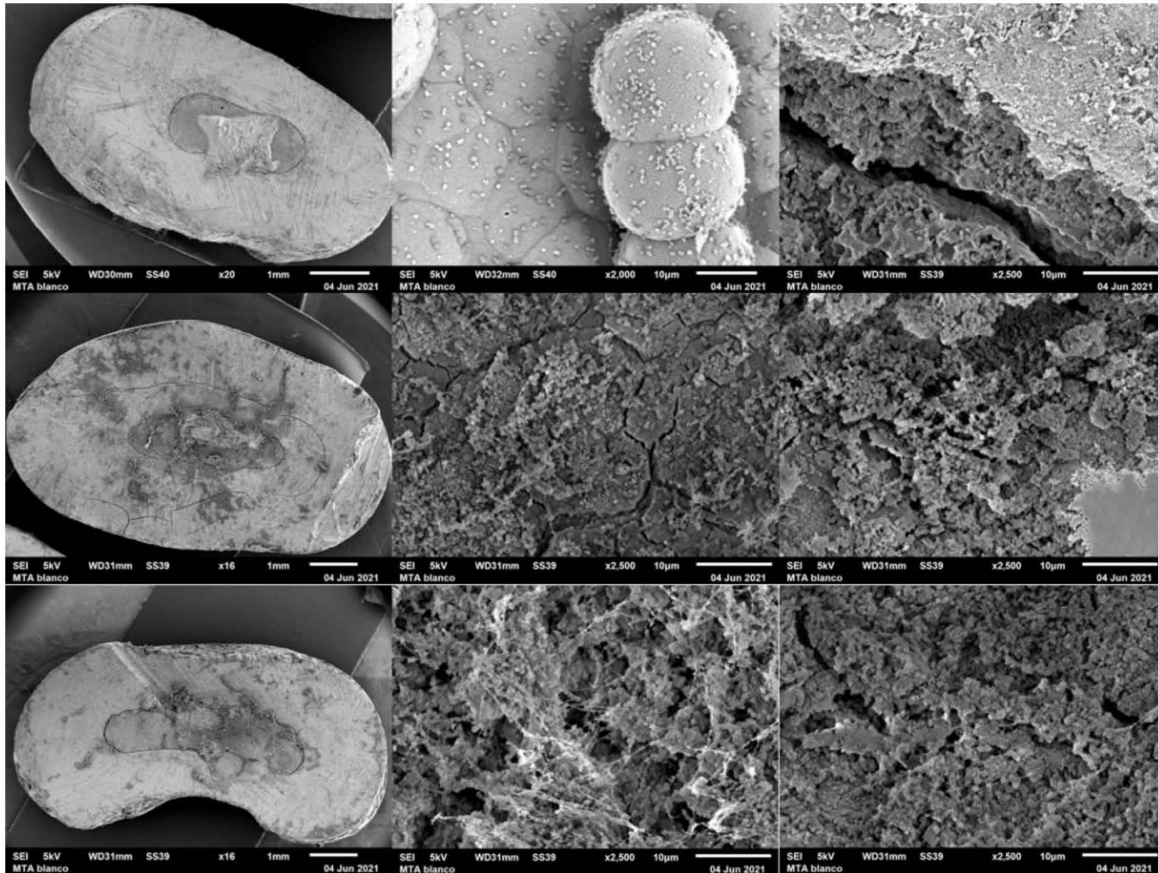
*Ruiz Flores A.*

**“EVALUATION OF BIOFILM FORMATION OVER MTA AND BIODETINE SURFACE AS ROOT END FILLING MATERIAL; AN INVITRO STUDY”**

**Negative Control MTA GRAY(MTAG)**

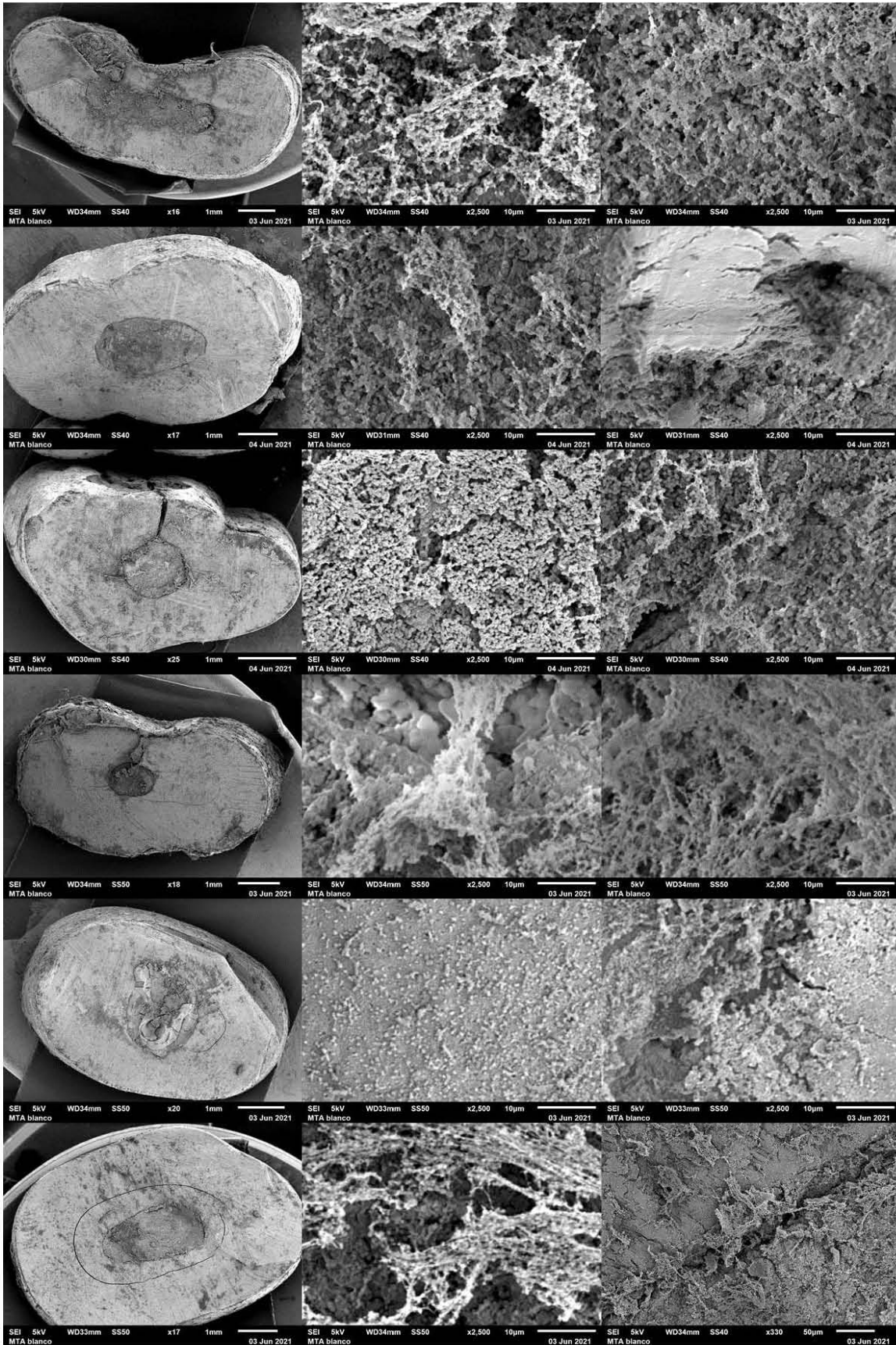


**Grup #2: MTA WHITE**



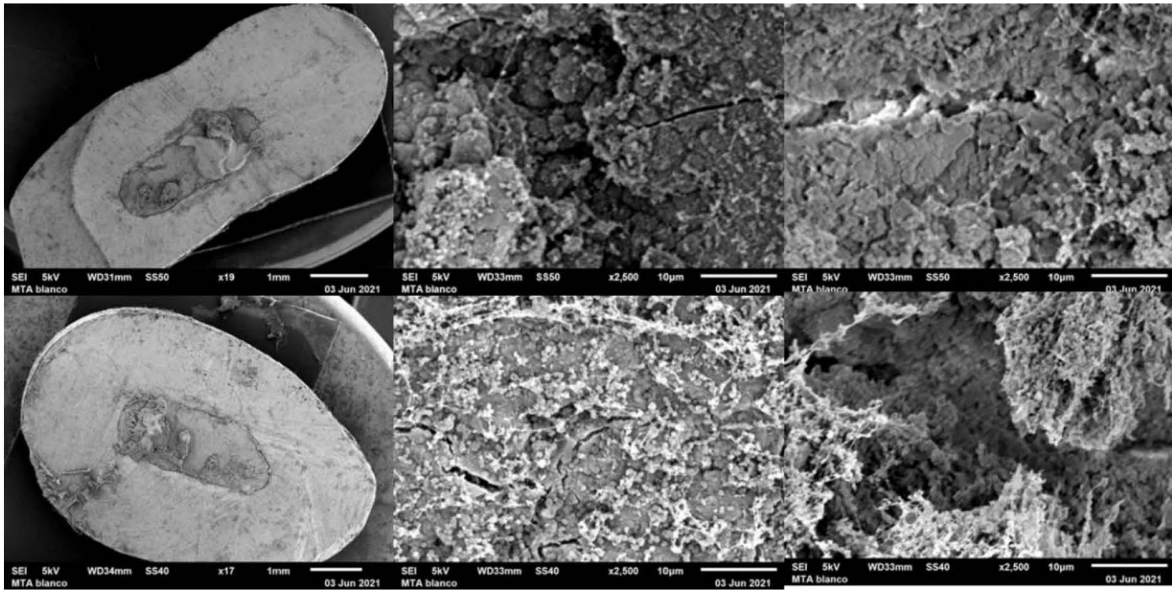
*Ruiz Flores A.*

**"EVALUATION OF BIOFILM FORMATION OVER MTA AND BIODETINE SURFACE AS ROOT END FILLING MATERIAL; AN INVITRO STUDY"**

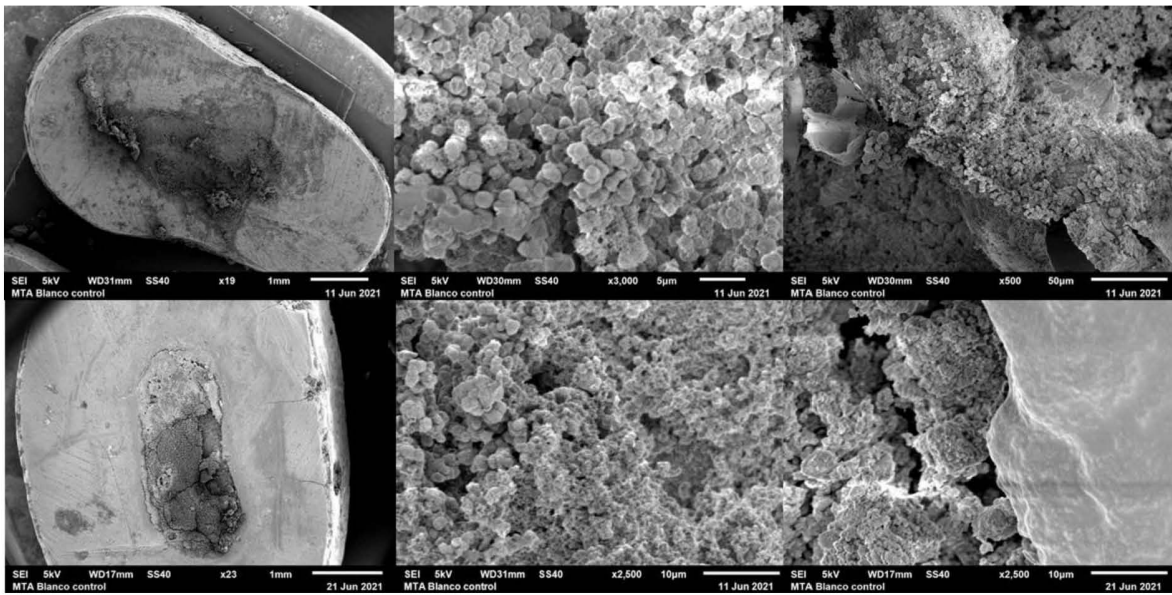


**Ruiz Flores A.**

**"EVALUATION OF BIOFILM FORMATION OVER MTA AND BIODETINE SURFACE AS ROOT END FILLING MATERIAL; AN INVITRO STUDY"**

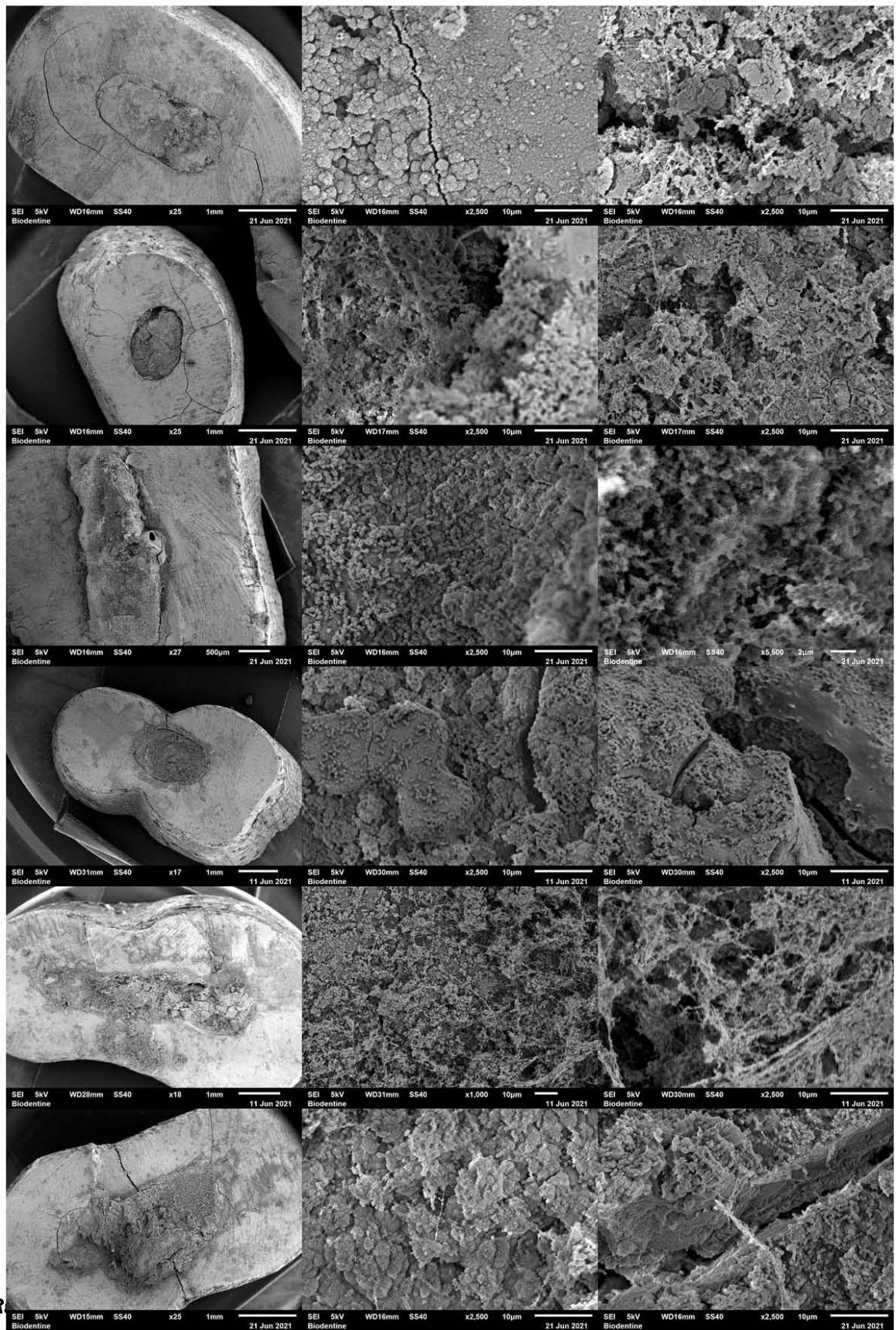


**Negative Contrl MTA WHITE (MTAW)**



**"EVALUATION OF BIOFILM FORMATION OVER MTA AND BIODENTINE SURFACE AS ROOT END FILLING MATERIAL; AN INVITRO STUDY"**

**Grup #3 BIODENTINE**



**“EVALUATION OF BIOFILM FORMATION OVER MTA AND BIODENTINE SURFACE AS ROOT END FILLING MATERIAL; AN INVITRO STUDY”**

**Negative Control BIODENTINE**

