



CATOLICA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

LISBOA·PORTO·VISEU

**BIOCERÂMICAS EM PERFURAÇÕES DE FURCA NUM MODELO DE
MICROINFILTRAÇÃO BACTERIANA.**

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de mestre em Medicina Dentária

Por:
Karina Camacho Freitas

Viseu, 2019



CATOLICA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

LISBOA · PORTO · VISEU

**BIOCERÂMICAS EM PERFURAÇÕES DE FURCA NUM MODELO DE
MICROINFILTRAÇÃO BACTERIANA.**

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de mestre em Medicina Dentária

Por:

Karina Camacho Freitas

Orientador: Professor Doutor Miguel Cardoso

Coorientador: Professora Doutora Rita Noites

Viseu, 2019

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor Miguel Cardoso, pelo contributo e disponibilidade que me concedeu, pela aquisição de novos saberes e pelo aconselhamento. Sem o seu suporte este trabalho não seria possível.

À minha coorientadora, Professora Doutora Rita Noites, pelo apoio e conhecimentos transmitidos no campo da Endodontia.

À Professora Sofia pela notável assistência que teve em toda a componente microbiológica. Obrigado pelos conselhos e críticas construtivas e pela disponibilidade imediata que sempre demonstrou ao longo deste projeto.

Ao meu companheiro, Alexander, obrigado por seres meu amigo, confidente e apoio neste grande percurso. Obrigado por estares sempre presente nos momentos mais difíceis, por acreditares que seria possível e nunca me deixares desistir.

Ao meu filho, Kévim, por me ter dado sempre força para ir mais além e por querer dar-te o exemplo que embora existam obstáculos que nos importunem, com vontade e determinação conseguimos os nossos sonhos.

Aos meus pais, obrigado pelo vosso apoio, exemplo e amor incondicional, sem vocês não seria possível a concretização deste percurso.

À Inês e a Beatriz por serem minhas amigas e tornarem este percurso um pouco mais agradável através da nossa cumplicidade.

À Doutora Dora pela colaboração no ato indispensável da esterilização dos materiais.

À Diana por ter dispensado algum do seu tempo para realizar algumas tarefas em conjunto. Obrigada pela paciência.

Resumo

Perfurações de furca podem ser definidas como comunicações entre a cavidade pulpar e o periodonto na região interradicular de dentes multirradiculares. São condições patológicas de tratamento complexo. O tratamento consiste em utilizar um material biocompatível para selar a cavidade e impedir a invasão de microrganismos. Atualmente, as biocerâmicas são uma boa opção para reparar perfurações de furca, sendo o ProRoot®MTA o material de eleição, não sendo desprovido de inconvenientes. Nesse sentido, têm surgido novos materiais tal como o Biodentine que permitem a recuperação da estrutura afetada e manutenção dos dentes.

Os principais objetivos deste estudo são, numa primeira fase, a validação de um novo modelo de microinfiltração bacteriana em perfurações de furca baseado no modelo de Torabinejad M., Friedman S. *et al.* e, numa segunda fase, a comparação da eficácia de resistência à microinfiltração bacteriana de *Enterococcus faecalis* após a reparação de perfurações de furca com Biodentine e ProRoot®MTA.

Foram selecionados e preparados 32 dentes hígidos que se dividiram aleatoriamente em 2 grupos teste: [Biodentine (reparação com Biodentine=12 dentes) e prMTA (reparação com ProRoot®MTA=12 dentes)] e em dois grupos controlo: [Controlo Pos (Com perfuração sem reparação= 4 dentes) e Controlo Neg (sem perfuração= 4 dentes)].

O número de dias necessários para esta bactéria penetrar o material reparador foi determinado.

Após avaliação dos resultados podemos validar o novo modelo de microinfiltração bacteriana em perfurações de furca.

Mais de 80 % das amostras foram contaminadas após 4 dias de exposição com *Enterococcus faecalis* tanto no grupo Biodentine como no grupo prMTA. No entanto Biodentine apresentou melhores resultados demorando mais tempo a ficarem todas as amostras contaminadas, no entanto sem diferença estatisticamente significativa. Concluímos que para o parâmetro de microinfiltração bacteriana, Biodentine pode ser uma alternativa válida ao ProRoot®MTA para reparações de perfurações de furca.

Palavras-chave:

Biodentine, ProRoot®MTA, microinfiltração bacteriana, *Enterococcus faecalis*.

Abstract

Furcal perforations can be defined as communications between the pulp cavity and the periodontus in the interradicular region of multiradicular teeth. The treatment of these pathological conditions is complex, consisting on the use of a biocompatible material to seal the cavity and prevent the invasion by microorganisms.

Currently, bioceramics are a good option for repairing furcal perforations, with ProRoot®MTA being the material of choice. However, it is, not devoid of inconveniences. Therefore, new materials have emerged, such as Biodentine that allow the recovery of the affected structure preserving the teeth.

The main objectives of this study are, firstly, the validation of a new model of bacterial microleakage in furcal perforations based on the model of Torabinejad M., Friedman S. *et al.* and, secondly, the comparison of the efficacy of resistance to bacterial microleakage of *Enterococcus faecalis* after repair of furcal perforation with Biodentine or ProRoot®MTA.

Thirty-two healthy teeth were selected and prepared and were randomly divided into two test groups: [Biodentine (repair with Biodentine= 12 teeth), and PrMTA (repair with ProRoot®MTA= 12 teeth)] and two control groups: [Controlo Pos. (with perforation and without repair= 4 teeth) and Controlo Neg (without perforation= 4 teeth)].

The number of days for bacterial penetration through the material was determined.

After evaluation of results, the new bacterial microleakage model in furcal perforations was validated.

More than 80% of the samples were contaminated after 4 days of exposure with *Enterococcus faecalis* both in group Biodentine and group prMTA. However Biodentine showed a trend for better results taking with longer times to contamination, although without statistical significance.

In conclusion, Biodentine may be a valid alternative to ProRoot®MTA for furcal perforations repair regarding microleakage.

Key- words:

Biodentine, ProRoot®MTA, bacterial microleakage, *Enterococcus faecalis*.

Índice

Agradecimentos	V
Resumo	VII
Abstract	IX
1-Introdução	1
1.1 Porta de entrada dos microrganismos	4
1.2 Ecologia dos microrganismos na infeção primária e secundária.....	4
1.3 Mecanismo da formação de biofilme endodôntico.....	5
1.5 Agentes antimicrobianos e biofilme	6
1.4 <i>Enterococcus faecalis</i>	6
1.5 Microinfiltração coronária.....	7
1.6 Perfurações de furca.....	8
1.7 Agregado trióxido mineral (MTA)	10
1.8 Biodentine	12
1.9 Modelos <i>in vitro</i> de microinfiltração bacteriana.....	13
1.10 Objetivos	14
2- Materiais e Métodos	15
2.1 Caracterização do estudo	17
2.2 Seleção e preparação dos dentes	17
2.3 Definição dos grupos de controlo e teste.....	23
2.4 Montagem do modelo experimental.....	24
2.5 Cultura bacteriana.....	26
2.6 Preparação das amostras para inoculação.....	27
2.7 Métodos estatísticos	29
3- Resultados	30
4- Discussão	37
5- Conclusão	44
6- Bibliografia	49

1-Introdução

Em 1988 Mitchell Levine definiu a endodontia como o ramo da medicina dentária que lida com a etiologia, diagnóstico e tratamento de doenças e lesões que afetam a polpa dentária e os tecidos periapicais (1). Dentro destas doenças e lesões periapicais encontram-se a patologia pulpar que engloba a hiperémia, pulpite reversível, pulpite de transição, lesões pulpares irreversíveis e necrose pulpar. E alterações degenerativas como a degenerescência cálcica, reabsorções e metaplasias (2).

Por outro lado, existe a patologia periapical que incorpora periodontite de evolução aguda como a periodontite apical aguda, abscesso alveolar agudo e abscesso de Phoenix; e de evolução crónica como o abscesso periapical crónico, granuloma, quisto apical e osteíte condensante (2).

O grande objetivo do tratamento endodôntico consiste no controlo e prevenção da infeção da cavidade pulpar que ocorre durante a instalação das lesões acima referidas.

Microrganismos como *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* são os principais agentes etiológicos responsáveis por patologia periapical, necrose pulpar e lesões patológicas após tratamento endodôntico canalar (3). A crescente resistência de tais microrganismos à medicação antimicrobiana tem sido uma preocupação da atualidade, uma vez que o mecanismo de defesa do hospedeiro não é capaz de eliminar o patógeno, sendo necessário eliminá-los através do desbridamento químico e mecânico com recurso à irrigação com agentes químicos do canal radicular (3).

Para um tratamento endodôntico bem-sucedido a preparação canalar mecânica, a irrigação, a obturação e a restauração pós-endodôntica são essenciais para conseguir os resultados pretendidos. Erradicar por completo os microrganismos do canal radicular é extremamente difícil mesmo utilizando medicação canalar e agentes químicos irrigadores. A sua manutenção neste meio pode levar à falência do tratamento endodôntico efetuado (4).

1.1 Porta de entrada dos microrganismos

As principais vias de atingimento da polpa pelas bactérias são por via coronária, via periodontal e via hemática.

Na via coronária as bactérias atingem a dentina através de cárie, contaminação de uma área de dentina exposta ou até por exposição pulpar após trauma como por exemplo fratura complicada da coroa (5).

A maioria da penetração dos microrganismos por esta via de atingimento ocorre pela infiltração de margens de restaurações ou pelos túbulos dentinários presentes na composição da dentina. A difusão por estes túbulos ocorre principalmente por bactérias gram-positivas e é cometido num processo lento. No entanto, existe a smear-layer que protege a dentina da infiltração bacteriana onde a profundidade da contaminação vai depender do diâmetro dos túbulos dentinários e consequente difusão do soluto (5).

Durante a doença periodontal aquando da presença de bolsas periodontais as bactérias poderão ter acesso à polpa através dos túbulos dentinários, de canais acessórios da polpa ou pelo foramen apical. Estas bactérias presentes na bolsa periodontal poderão também ser responsáveis pela persistência da infeção periodontal. Assim sendo, a invasão bacteriana pelos túbulos dentinários devido às bolsas periodontais poderão não ser eliminados através de terapia periodontal como fases higiénicas mecânicas e químicas. Estas bactérias originarão uma resposta inflamatória contribuindo para uma infeção persistente (6).

Por último, através da via hemática estabelece-se uma anacorese hematogénica. Anacorese é definido por Robinson e Boling como um fenómeno pelo qual as bactérias presentes na circulação são atraídas por um tecido inflamado circunscrito. Logo, granulomas e inflamações periapicais crónicas são focos de atração destas bactérias provenientes de doenças sistémicas (7).

1.2 Ecologia dos microrganismos na infeção primária e secundária.

Os biofilmes bacterianos endodônticos são classificados como: biofilme intracanal, extraradicular, periapical e centradas num biomaterial (8).

O biofilme intracanal estabelece-se na periodontite apical primária e secundária. A periodontite apical primária ocorre em dentes nunca submetidos a tratamento endodôntico e, cura após a conclusão de um tratamento endodôntico radical combinando o desbridamento mecânico com irrigação e obturação canal. É composto por espécies predominantemente anaeróbias estritas tais como *Treponema denticola*, *Porphyromonas endodontalis* ou *Pseudoramibacter alactolyticus*. Contudo, o tratamento destes canais sem sucesso geram uma infecção persistente chamada de infecção periapical secundária que é constituída por bactérias maioritariamente anaeróbias facultativas gram positivas incluindo *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Enterococcus* (9).

Estudos têm estabelecido a capacidade do *Enterococcus faecalis* desenvolver biofilmes em diferentes condições ambientais e nutricionais (aeróbios, anaeróbios, ricos em nutrientes e privados de nutrientes) (8).

1.3 Mecanismo da formação de biofilme endodôntico

Em qualquer ambiente natural, macromoléculas e microrganismos têm uma forte tendência a se associarem a superfícies formando comunidades microbianas aderentes (10).

A fase mais precoce da formação de biofilme envolve a absorção de macromoléculas na fase planctônica à superfície (10). Nas superfícies dentárias, a película de condicionamento é constituída por proteínas, glicoproteínas da saliva e do fluido crevicular e alguns produtos microbianos secretados (11). A segunda etapa envolve a adesão e co-aderência de microrganismos. A terceira etapa, e última, supõe a multiplicação que resultará numa comunidade microbiana mista estruturada (10).

Este mecanismo instaura-se quando há a penetração do microrganismo na polpa unindo-se e espalhando-se ao longo do canal radicular. É após a formação do biofilme que o processo infeccioso ganha energia suficiente para causar subsequente destruição do tecido pulpar (8).

Nalgum momento deste processo é atingido um estado estacionário onde a massa bacteriana é mantida pelos mecanismos de defesa do hospedeiro (12).

1.5 Agentes antimicrobianos e biofilme

Os antimicrobianos são usados para o controlo de biofilmes e têm sido frequentemente desenvolvidos e otimizados contra a atividade de populações de rápido crescimento. No entanto, as comunidades microbianas contidas num biofilme são notavelmente difíceis de erradicar com o uso de antimicrobianos e quando estão compreendidos em biofilmes maduros podem ganhar resistência (13).

A natureza do organismo, o agente antimicrobiano e a concentração determinam a resposta dos microrganismos aos antimicrobianos (14).

A resistência é definida como a capacidade de um microrganismo crescer na presença de altos níveis de um agente antimicrobiano ou de sobreviver ao tratamento de um agente antimicrobiano (14). Esta resistência pode ser classificada em dois tipos: intrínseca ou adquirida. A intrínseca, ou inata, é a resistência natural e adaptação fisiológica de um determinado microrganismo particular. A adquirida refere-se à que resulta de mutações e à seleção de mutantes resistentes de uma população exposta a agentes antimicrobianos (15).

Alguns antimicrobianos utilizados na área da endodontia na irrigação ou obturação são: hipoclorito de sódio, clorexidina, hidróxido de cálcio, peróxido de hidrogénio, sulfato férrico, entre outros (14).

1.4 *Enterococcus faecalis*

Existem microrganismos de microbiota oral normal sendo que o *Enterococcus faecalis* não faz parte deste, já que é frequentemente associado a canais radiculares obturados com periodontite crónica apical induzindo à falência do tratamento endodôntico. Este microrganismo pode ser encontrado normalmente no trato gastrointestinal e no trato genital (16).

É uma bactéria anaeróbia gram-positiva facultativa encontrada em raízes com lesões periapicais persistentes devido à sua capacidade de penetrar nos túbulos dentinários e cemento (16). Alguns estudos indicam que está presente em 77% dos casos de terapia endodôntica fracassada podendo ser capaz de resistir a medicações intracanales (17,18).

A resistência adquirida deste microrganismo deve-se a fatores de virulência como a substância de adesão, feromônios sexuais, ácido lipoteicóico, produtos de superóxido extracelular, enzimas líticas gelatinase e toxina citolisina. Também a enzima conversora de angiotensina e a serina protease ajudam na ligação à estrutura dentária (18).

Sendo um patogénico oportunista causa infeções nosocomiais podendo crescer em pH extremamente alcalino e sobreviver a uma temperatura de 60°C por 30 minutos. Também é capaz de suprimir a ação dos linfócitos contribuindo para a falência endodôntica (19).

A literatura encontra algumas explicações para que este microrganismo esteja presente maioritariamente nas infeções persistentes em comparação com infeções primárias que ronda os 1% de contaminação. Uma destas explicações supõe que em infeções primárias já possa estar presente, mas em concentrações muito baixas tornando difícil a sua deteção. Outro fundamento é que esta bactéria coloniza os canais por falha na cadeia de asepsia durante o tratamento ou por restaurações provisórias mal executadas ou ainda por várias sessões de tratamento que aumentam a probabilidade da sua colonização (20).

Já que este microrganismo pode ser inoculado no interior dos canais radiculares durante os procedimentos endodônticos, Peter *et al.* no seu estudo afirmaram que uma boa técnica de obturação após limpeza, modelagem e desinfecção permite que as bactérias remanescentes nos túbulos sejam inativadas ou impedidas de repovoamento do canal radicular (21).

Atualmente também supõe-se que o uso do laser Er,Cr: YSGG com ou sem solução irrigadora possa conseguir uma ação antimicrobiana em canais contaminados com *E. faecalis* (22).

1.5 Microinfiltração coronária

Como já referido a microinfiltração coronária é a causa mais comum de falhas do tratamento endodôntico. Assim sendo algumas causas que estarão na origem da entrada de microrganismos na obturação canalar serão: perda, infiltração ou fratura da restauração temporária ou definitiva; fratura da peça dentária; recidiva de cárie; defeito ou omissão do isolamento absoluto durante o tratamento (23). Ao colonizarem o canal vão dirigir-se até apical e libertar produtos do seu metabolismo que irão originar patologia apical (24).

Ao longo dos anos têm sido desenvolvidos alguns estudos que geraram modelos *in vitro* de microinfiltração utilizando bactérias, sendo que independentemente do material e técnica de obturação utilizados, se houver exposição dos canais, estes serão contaminados em cerca de 30 dias. Torabinejad et al. (25), Swanson e Madison (26) e Khayat et al. (27) são alguns dos autores destes estudos. Nas suas conclusões referiam que um canal tratado se estiver em contacto com o microbiota oral durante mais de 3 meses deve ser executado o retratamento canalar para evitar infeção periapical (28).

Contudo, ainda há algumas questões a elucidar, tal como: o período que após exposição se deve aguardar até proceder ao retratamento, a quantidade mínima do microrganismo para estabelecer patologia periapical, a possibilidade de desenvolver novos materiais de obturação que sejam competentes na erradicação de microrganismos infiltrados e desenvolvimento de fármacos que impermeabilizem a dentina ao microbiota oral (29).

1.6 Perfurações de furca

Durante o tratamento endodôntico podem ocorrer lesões iatrogénicas tal como uma perfuração de furca durante o acesso canalar.

Perfuração radicular é definida como uma abertura artificial que liga a cavidade pulpar aos tecidos perirradiculares e osso alveolar, normalmente de etiologia iatrogénica. Também pode ser causada por condições patológicas, tais como o processo de cárie e reabsorção. Tais perfurações são a segunda causa mais comum de tratamentos endodônticos falhados (30). Normalmente ocorre quando o operador carece de conhecimento adequado das dimensões da câmara pulpar ou das variações anatómicas do dente específico (31). O pavimento da câmara pulpar é o local onde as perfurações ocorrem mais frequentemente. As raízes mesiovestibulares de molares maxilares e, mesiais de molares mandibulares são altamente suscetíveis a perfurações devido às suas finas paredes dentinárias (32).

A instrumentação inadequada não evitando a zona de perigo e sobreinstrumentação de canais de raízes finas podem levar à perfuração (32).

As manifestações clínicas de perfuração são: dor imediata à ação dos instrumentos e sangramento súbito e intenso (33). O seu diagnóstico pode ser efetuado através

de uma radiografia periapical, no entanto por si só é um método de diagnóstico limitado. O diagnóstico mais fiável obtém-se através da associação de métodos clínicos como sondagem periodontal, uso de localizador apical e radiografia, incluindo a tomografia de feixe cónico (34).

A perfuração em qualquer região leva à passagem de bactérias e seus produtos tóxicos para os tecidos periodontais e periapicais originando dor e inchaço. Se não tratada pode levar à infeção periapical, reabsorção do osso circunscrito ou perda dentária (35).

Os avanços atuais em endodontia e biomateriais tornaram possível a recuperação da estrutura e da função dentária, mesmo nos casos mais complicados. Mas apesar destes avanços a melhor abordagem ainda não está clara. A extrusão do material reparador, o selamento inadequado e a falta de biocompatibilidade estão entre as dificuldades descritas. Contudo, as opções terapêuticas disponíveis baseiam-se em relatórios clínicos inconsistentes, elevando a necessidade de estudos *in vitro* e *in vivo* em condições controladas que simulem as características clínicas (36).

Durante o seu tratamento deve ser impedida a instalação de uma infeção bacteriana para melhorar o prognóstico. Este último depende da quantidade de tempo que a perfuração é aberta para ocorrer uma possível contaminação, posição da perfuração, do tamanho da perfuração, possibilidade do seu selamento e acessibilidade do canal principal (32,37). Alguns autores sugerem o uso de uma matriz interna para evitar o extravasamento do material de selamento e consequente inflamação do tecido periradicular. O intervalo da perfuração é um dos fatores críticos para o sucesso, visto que, o selamento imediato reduz a possibilidade de contaminação bacteriana (38).

A reparação de perfurações pode ser realizada por via cirúrgica ou não cirúrgica, dependendo das características particulares do caso (37).

O material ideal para o tratamento de perfurações endodônticas deve induzir a osteogénese e cementogénese, ser biocompatível, não absorvível, radiopaco, bacteriostático ou bactericida, não tóxico e fácil de aplicar. Assim, deverá selar firmemente a perfuração (35).

O objetivo principal do tratamento de perfurações é deter o processo inflamatório e a consequente perda de inserção tecidular. No entanto se esta já estiver instalada é importante promover a reinserção dos tecidos, antes de dar continuidade ao tratamento de canais (34).

Em dentes permanentes, vários materiais têm sido sugeridos para a reparação de perfurações tais como amálgama, hidróxido de cálcio, cimentos reforçados com óxido de zinco eugenol, agregado trióxido mineral (MTA), cimento de mistura enriquecido com cálcio (CEM) e biodentine (39).

1.7 Agregado trióxido mineral (MTA)

Como o próprio nome indica o MTA é composto por um agregado de trióxidos minerais. Entre 1992 e 1993 uma equipa liderada pelo Professor Torabinejad desenvolveu numa universidade da Califórnia um material para a cirurgia endodôntica quando o campo cirúrgico é húmido e tem que estar em contacto com os tecidos periradiculares e/ou polpa (40).

Em 1998 foi aprovada para uso endodôntico, sendo primeiramente comercializada como ProRoot™ MTA (36). No entanto, surgiram novas formulações do mesmo que foram melhorando algumas das características deste produto. MTA Angelus, OrthoMTA, RetroMTA ou Angelus MTA-Fillapex são alguns exemplos destas formulações mais recentes.

Do ponto de vista físico-químico, o MTA é um pó composto por finas partículas hidrofílicas que endurecem na presença de humidade e quando é adicionada água destilada na proporção de 3:1 (1g de MTA para 0,35g de água destilada) existe a formação de um gel que endurece após 2-3 horas. Após a mistura o pH ronda os 11 e após 3 horas aumenta para 12,5. O tempo de endurecimento do MTA é visto como uma desvantagem já que pode irritar os tecidos circundantes e haver desagregação do material até ao momento da presa (41). Após 24 horas do momento da colocação tem aproximadamente 40 de resistência à compressão (menor que o IRM (material restaurador intermediário) ou amálgama). No entanto, após 21 dias atinge uma força média de compressão de 67 MPa. Este último parâmetro não deve ser visto como um ponto negativo já que o material de preenchimento da perfuração não deve resistir diretamente às forças de mastigação. Quanto à capacidade de selamento e de acordo com estudos *in vitro* feitos com azul de metileno, a profundidade linear da penetração da tintura não foi significativamente diferente em comparação com outros materiais como IRM (material restaurador intermediário) ou Super-EBA® (41). Quanto ao efeito antibacteriano, MTA mostra algum efeito, embora fraco, em relação às bactérias anaeróbias facultativas e, nenhum efeito face a bactérias anaeróbias estritas. Nenhum dos outros materiais existentes mostrou segundo estudos um efeito

eficiente antimicrobiano (42). Sobre a citotoxicidade e biocompatibilidade MTA comparativamente ao IRM (material restaurador intermediário) ou amálgama mostrou-se menos citotóxico e mais biocompatível (43). Do ponto de vista químico é constituído por óxido de cálcio e fosfato de cálcio como componentes principais (43).

Existem várias indicações para o uso deste biomaterial (44). Em pulpotomias, realizadas maioritariamente em pacientes jovens e sem sintomatologia associada, alguns estudos em modelo animal verificaram que o MTA induzia a formação de pontes dentinárias mais eficazmente em comparação com hidróxido de cálcio (45). Aquando de uma exposição pulpar que ocorre durante a remoção de uma cárie muito profunda podemos também utilizar MTA com uma espessura de cerca de 3 mm colocando uma bola de algodão embebida com água destilada e selando o dente com material provisório (46). No caso de apexogénese de um dente permanente com crescimento inacabado da raiz no qual sofreu traumatismo ou necrose pulpar de modo a colocar um material de enchimento canal podemos ainda utilizar MTA já que o hidróxido de cálcio apesar de ter uma taxa de sucesso de 74 a 100% apenas serve de barreira de 5 a 20 meses (47). Alguns estudos concluíram que MTA consegue maior formação de tecido mineralizado comparativamente com hidróxido de cálcio tornando-se numa boa alternativa para apexificações (48). Em casos de perfurações de furca que têm que ser obliterados imediatamente, também o MTA se tem revelado um bom selador para este tipo de iatrogenias já que em estudos feitos em cães ao contrário de outros materiais como amálgama ou hidróxido de cálcio não houve processo inflamatório por cima do material, havendo sim a formação de cimento (44).

Pesquisadores relataram que MTA estimula osteoblastos a libertar interleucina-4, formando tecido duro e elaborando uma interface com a dentina muito semelhante à de hidroxiapatite (40).

Por fim, como desvantagens atribuídas a este material estão um longo tempo de endurecimento, possível alteração de cor do dente tratado, difícil manipulação e custo elevado (49).

1.8 Biodentine

Em 2009 foi desenvolvido um novo material de silicato de cálcio chamado Biodentine que alega ter propriedades benéficas tais como excelente capacidade de selamento, biocompatibilidade, boa estabilidade dimensional, tempo de presa curto, fácil manipulação ou força mecânica melhorada que pode satisfazer alguns dos inconvenientes encontrados no MTA e que pode ser usado na reparação de perfurações de furca (50).

O pó é composto principalmente por silicato tricálcico de alta pureza regulando a reação de endurecimento. Outros componentes são carbonato de cálcio (enchimento) e dióxido de zircônio (radiopacificador). O líquido contém cloreto de cálcio (acelerador de presa), agente redutor de água (superplastificante) e água. O superplastificante reduz a viscosidade do cimento e melhora o manuseamento (51). A reação do pó com o líquido conduz ao endurecimento do cimento. Logo após a mistura, as partículas de silicato de cálcio de Biodentine reagem com a água formando um gel de silicato de cálcio hidratado (52).

Como indicações clínicas o fabricante alega poder ser utilizado para capeamento pulpar, pulpotomia, apexificação, perfuração radicular, reabsorções internas e externas e como preenchimento radicular em cirurgias periodontais (53).

Butt N. et al. (54) compararam MTA Angelus™ e Biodentine quanto às propriedades físicas e mecânicas e concluíram que Biodentine apresenta manuseamento mais fácil e maior resistência às forças compressivas.

A presença de um acelerador, diminuindo o tempo de presa, é uma vantagem sobre o MTA uma vez que um tempo de presa tardio leva a um risco aumentado de perda parcial de material e alteração da interface estrutura dentária/material reparador (55). Noutro estudo, Camilleri (56) concluiu que Biodentine evidencia melhor microdureza quando comparado com ionómero de vidro convencional ou ionómero de vidro modificado com resina.

Grech et al. em sua investigação chegaram à conclusão que Biodentine tem uma força compressiva aumentada devido à baixa relação água/cimento (57).

Num estudo acerca das forças de aderência, Aggarwal et al. sugerem que Biodentine apresenta melhor força de aderência após 24 horas comparado com MTA Plus™, embora após 1 semana as forças de aderência de Biodentine e MTA sejam

semelhantes. Neste estudo também se concluiu que a contaminação com sangue em nada afeta a aderência às paredes dentinárias desta biocerâmica (58).

A densidade e porosidade são fatores críticos já que um maior diâmetro de poros indica maior transmissão de microrganismos dando origem a um comprometimento de selamento hermético. Contudo, Biodentine apresenta menor porosidade devido ao seu baixo teor de água (59).

Quanto à estabilidade de cor, Biodentine é procurado por apresentar menor descoloração em relação a outros materiais restauradores como Bioaggregate™ ou MTA Angelus™ (60).

Rodrigues et al., no seu estudo em 2017, concluíram que Biodentine apresenta biocompatibilidade e bioatividade, sendo que tem melhor efeito mineralizador do que MTA Angelus™ (61).

Por fim, quanto à atividade antimicrobiana, Kharabe et al. revelaram que Biodentine tem atividade antimicrobiana em aeróbios e anaeróbios facultativos (62). Já Özyürek et al. afirmam ter atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecium* (63).

1.9 Modelos *in vitro* de microinfiltração bacteriana

Em 1990, Torabinejad desenvolveu um modelo de microinfiltração bacteriana no qual foram usados 45 dentes. Os canais foram instrumentados e obturados com gutta-percha e depois foram administradas no modelo as espécies *Staphylococcus epidermidis* e *Proteus vulgaris*, sendo que após 30 dias ficaram contaminadas as obturações de mais de 88% dos modelos com *S. epidermidis* e após 66 dias mais de 85% dos dentes inoculados foram contaminados com *P. vulgaris* (25).

Khayat et al.(27) realizaram um estudo no qual prepararam e obturaram 40 canais, colocaram-nos num ambiente com saliva humana e determinaram quantos dias demoravam as bactérias da saliva a penetrar a obturação. Concluíram que todos os dentes ficaram contaminados em menos de 30 dias.

Magura et al. (28), em 1991, desenvolveram um estudo no qual prepararam 160 dentes humanos e obturaram com gutta percha, imergindo-os em 50 ml de saliva humana. Realizando cortes histológicos conseguiram evidenciar que após 3 meses todos os dentes tinham sido contaminados, sendo que clinicamente uma peça

dentária endodonciada que esteja exposta ao microbiota oral por pelo menos 3 meses se deve ponderar fazer um retratamento.

Pollard et al. realizaram o tratamento endodôntico de 60 dentes e imergiram-os em tinta da china. Após 7 dias mediram a infiltração de corantes com um estereoscópio e verificaram que todos os dentes tinham sido corados (64).

Barriechi et al. (65) utilizaram um modelo *in vitro* no qual obturaram 40 canais medindo os dias em que eram afetados pelas espécies *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros* e *Campylobacter rectus* e verificaram que a penetração bacteriana ocorreu entre 48 a 84 dias.

Em 2008 João Marques dos Santos realizou um estudo no qual avaliou a eficácia do gel de clorhexidina a 2% num modelo *in vitro* aplicado como medicação intracanal durante 7 dias. Concluiu que apenas conferia resistência adicional para a espécie *C. albicans* e não para *E. faecalis* (29).

1.10 Objetivos

Os principais objetivos deste estudo são, numa primeira fase, a validação de um novo modelo de microinfiltração bacteriana em perfurações de furca baseado no modelo de Torabinejad M., Friedman S. et al. e, numa segunda fase, a comparação da eficácia de resistência à microinfiltração bacteriana de *Enterococcus faecalis* após a reparação de perfurações de furca com Biodentine® e ProRoot®MTA no modelo validado.

Hipótese

H0: não existem diferenças na microinfiltração bacteriana entre a reparação com Biodentine e a reparação com ProRoot®MTA.

2- Materiais e Métodos

2.1 Caracterização do estudo

O presente estudo é do tipo experimental *in vitro* sobre o comportamento das biocerâmicas, nomeadamente, ProRoot®MTA e Biodentine, como materiais reparadores no tratamento de perfurações de furca num modelo de microinfiltração bacteriana com o microrganismo *Enterococcus faecalis*.

2.2 Seleção e preparação das amostras

Para a realização do estudo utilizaram-se 32 molares multirradiculares humanos, molares mandibulares com duas raízes bem diferenciadas e região de furca bem delimitada, conservados em hipoclorito de sódio (Fig.1). Realizou-se o acesso endodôntico (Fig. 2) tentando-se padronizar a forma da cavidade para posterior adaptação da seringa. (Fig. 3). De seguida procedeu-se à limpeza da entrada dos canais com a ajuda de ultrassons. Procedeu-se ao corte de 3 mm terminais das raízes e respetiva limpeza da polpa canalar. Fez-se a restauração com compósito bulk-fill das entradas canalares assim como também das terminações das raízes (Fig.4 e 5). Por fim, nos grupos teste e controlo positivo, executou-se uma perfuração da furca (Fig. 6) com broca esférica 012 diamantada em turbina a baixa rotação. Posteriormente foi obturada com Biodentine™ ou ProRoot®MTA (Fig. 7 a 18) nos grupos de teste respetivos. Esta restauração foi feita com a ajuda de uma esponja e compressa que servia de stop de modo a mimetizar os tecidos perirradiculares (Fig.19).



Figura 1- Molares antes da preparação



Figura 3- Cavidade de acesso individual



Figura 2- Broca utilizada para a padronização das cavidades de acesso (seta vermelha)



Figura 4- Restauração das terminações radiculares com resina bulk-fill.



Figura 5- Materiais restauradores utilizados para selar as raízes.



Figura 6- Perfuração de furca.



Figura 7- Restauração da perfuração com Biodentine™.



Figura 6- Restauração da perfuração com ProRoot® MTA.



Figura 7- Ampola de Biodentine utilizada para restaurar as perfurações.



Figura 8- Apresentação comercial do MTA para restaurar as perfurações.



Figura 11- Preparação do ProRoot®MTA.

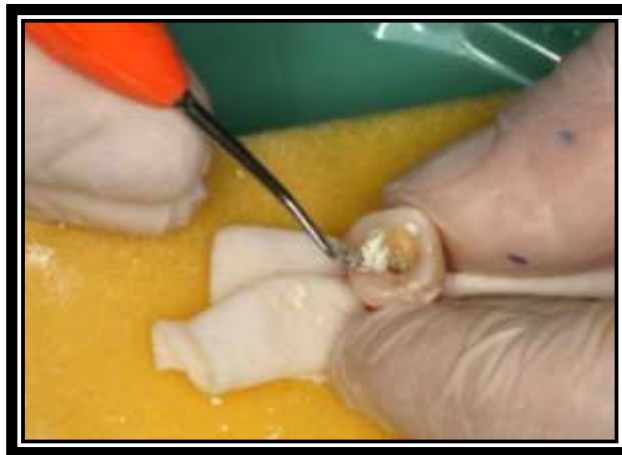


Figura 12- Inserção do ProRoot®MTA na cavidade de acesso.



Figura 13- Obturação por apical com ProRoot®MTA

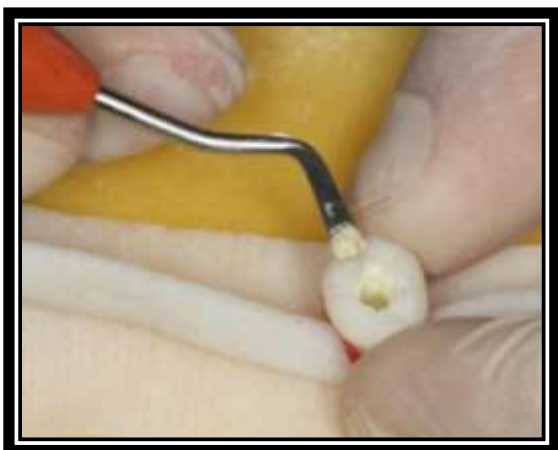


Figura 14- Inserção de Biodentine no dente

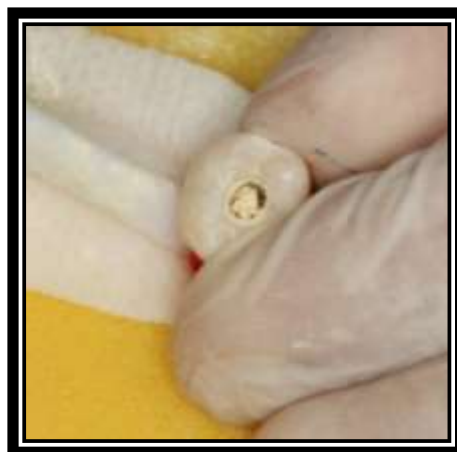


Figura 15- Biodentine na cavidade de acesso.

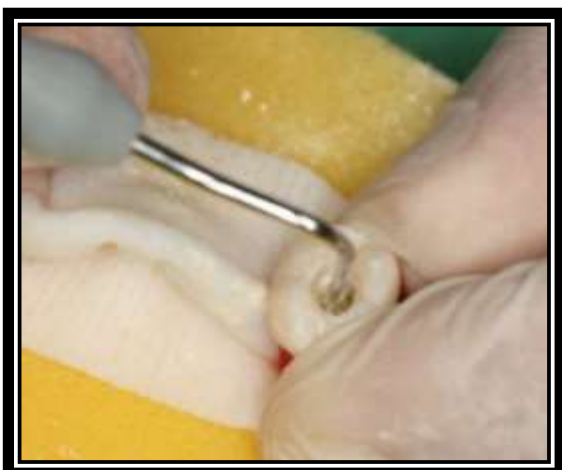


Figura 16- Compactação de Biodentine na perfuração.

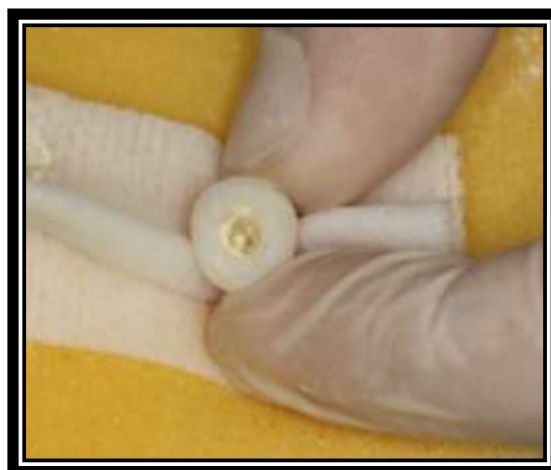


Figura 17- Biodentine já compactado na perfuração.



Figura 18- Visualização da obturação por apical.



Figura 19- Utilização de uma esponja e compressa para a restauração das perfurações.

2.3 Definição dos grupos de controlo e teste

Os dentes foram divididos aleatoriamente em 4 grupos, 2 grupos de teste e dois de controlo.

Um grupo teste foi constituído por 12 dentes restaurados com Biodentine™ (Grupo Biodentine) (Fig. 20). O outro grupo teste foi integrado por 12 dentes restaurados com ProRoot®MTA (Grupo prMTA) (Fig. 21). O controlo positivo foi formado por 4 dentes (Controlo Pos) (Fig. 22) e apenas realizou-se uma perfuração de furca sem qualquer restauração de biocerâmica. Por último, o nosso controlo negativo foi composto por 4 dentes (Controlo Neg) (Fig. 23) no qual não foi realizada qualquer perfuração nem restauração.



Figura 20- Grupo Biodentine.



Figura 91- Grupo prMTA.



Figura 22- Controlo Pos.



Figura 23- Controlo Neg.

2.4 Montagem do modelo experimental

Adquiriram-se 32 frascos transparentes juntamente com 32 seringas milimetradas. Após o processamento dos grupos foi cimentada uma seringa na cavidade de acesso realizada. Introduziu-se a seringa pré-cortada (Fig. 24) na tampa do frasco e colou-se de maneira à região da furca ficar no centro do frasco. De seguida, revestiu-se todo o dente (exceto a região da perfuração) com verniz (Fig. 25).

O conjunto formado pela seringa e dente (Fig. 26) foi introduzido em mangas e foi realizada a esterilização no sistema V-PRO com vapor de peróxido de hidrogénio a 59%.

Os frascos foram esterilizados à parte em mangas em autoclave a 130° C.



Figura 24- Seringa pré cortada com um disco.



Figura 25- Colocação de verniz na porção radicular da peça dentária com exceção da perfuração.



Figura 26- Conjunto formado pela tampa, seringa e peça dentária.

2.5 Cultura bacteriana

Para testar a eficácia de resistência à microinfiltração bacteriana foi usada a estirpe de coleção *Enterococcus faecalis* (ATCC 25212). Antes de iniciar os ensaios de microinfiltração bacteriana, a identificação da estirpe foi confirmada por amplificação e sequenciação do segmento de DNA que codifica para a subunidade ribossomal 16S. A amplificação dos segmentos de DNA que codificam para rRNA 16S foi realizada utilizando os *primers* universais para bactérias 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG e 1492R 5'-TACCTTGTTACGACTT (66). As reações de PCR foram preparadas num volume total de 25 µL, contendo: 2,5 µL de cada *primer* (10 µM), 1 µL de DNA molde (concentração não determinada), 6,25 µL de NZYTag 2x Green Master Mix (NZYTech, Portugal) e água estéril até perfazer o volume final. As reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos; 30 ciclos de amplificação de (i) 1 min a 94°C para desnaturação, (ii) 1 min a 55°C para a hibridação dos *primers* e (iii) 1,5 min a 72°C para a extensão; extensão final durante 10 min a 72°C. A confirmação da dimensão e integridade do produto de PCR foi realizada após separação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 1x, com Green Safe e visualização através de luz UV com a imagem Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad, USA). Após sequenciação do produto de PCR amplificado, a sequência foi confrontada com as sequências depositadas na base de dados GenBank (NCBI).

Os meios de cultura- Luria-Bertani broth (LB) e LB- agar – foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 min, logo após preparação segundo as instruções do fabricante. A partir de colónias isoladas (LB-agar), procedeu-se à cultura em meio líquido (LB), durante 48 h, a 37°C e 100 rpm, numa incubadora orbital. Posteriormente a estirpe de coleção foi criopreservada, no mesmo meio contendo 20% de glicerol, a -80°C.

2.6 Preparação das amostras para inoculação

De acordo com o modelo de Torabinejad (25) e a partir de uma cultura bacteriana descrita no ponto anterior, preparou-se uma suspensão bacteriana em solução salina (0,9% NaCl) de modo a ajustar a densidade celular de $1,5 \times 10^7$ unidades formadoras de colônia UFC/mL (equivalente a uma DO_{600} de 0,6). Esta suspensão celular foi utilizada para inoculação do novo modelo de microinfiltração bacteriana. No interior de uma câmara de fluxo laminar foi colocado meio de cultura (LB) nos frascos e a montagem dos dentes no frasco foi realizada de maneira à região da furca ficar imersa em meio de cultura (Fig. 27 a 29). Para confirmar o processo de esterilização estes modelos foram conservados durante 3 dias na câmara de fluxo laminar antes de proceder à inoculação dos microrganismos. Os frascos foram selados e os dentes inoculados com 100 μ L da suspensão de microrganismos no interior da câmara pulpar. O inóculo foi renovado de 4 em 4 dias. O meio de cultura foi examinado diariamente até detetar turbidez (crescimento). O registo de resultados incluiu a identificação do frasco e a data em que se verificou crescimento bacteriano.



Figura 27- Modelo de microinfiltração bacteriana no 1º dia da inoculação.



Figura 28- Controlo negativo no 1º dia da inoculação.



Figura 29- Controlo positivo no 1º dia da inoculação.

2.7 Métodos estatísticos

Realizou-se a análise estatística com recurso ao programa estatístico SPSS (versão 22, SPSS, Inc., Chicago, IL). Determinou-se a normalidade das distribuições usando o teste de Shapiro-Wilk. Usou-se o teste Kruskal-Wallis seguido do teste Mann-Whitney U entre cada 2 grupos com correção apropriada pelo método de Holm-Bonferroni. Considerou-se significância para $p < 0,05$. Os valores são expressos pela mediana e diferença interquartis (IQ)

3- Resultados

O número de espécimes de cada grupo que apresentaram contaminação com *E. faecalis*, bem como a data da sua ocorrência, estão apresentados na tabela 1. No grupo Controlo Pos a contaminação do meio ocorreu de forma rápida, verificando-se que ao fim de 2 dias todas as amostras do grupo apresentaram contaminação (Fig. 30). Por outro lado, nos grupos controlo negativo não ocorreu qualquer contaminação ao longo de todo o período experimental (Fig. 31).

Tabela 1- Tratamento efetuado e tempo decorrido até à contaminação com *E. faecalis*.

Grupo	n	Contaminação	
		Espécimes	Tempo (dias)
Biodentine	12	12	4,5,7
prMTA	12	12	4,5
Controlo Pos	4	4	2
Controlo Neg	4	0	--

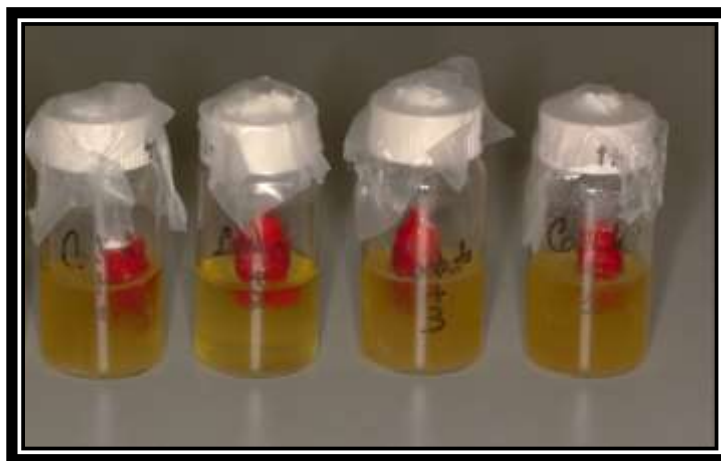


Figura 30- Controlos positivos ao 2º dia após a inoculação.



Figura 31- Controlos negativos ao fim do estudo.

Em relação aos grupos Biodentine e prMTA podemos verificar que a maior parte das contaminações ocorreu, mais frequentemente, ao fim do 4º dia, sendo que ao fim do 7º dia todas as amostras com Biodentine se encontravam contaminadas e ao fim de 5 dias todas as amostras com ProRoot®MTA apresentavam turbidez (Fig. 32).

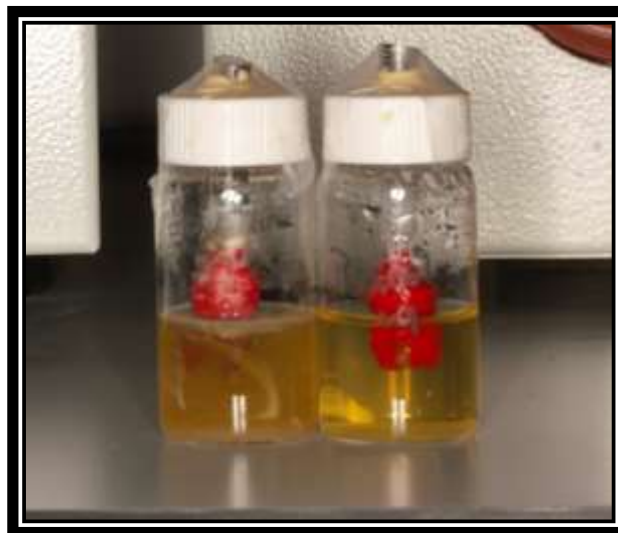


Figura 32- Comparação de uma amostra contaminada e não contaminada no 4º dia do estudo.

Ambos os grupos teste apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados com o controlo positivo [Mediana (IQR) de dia de contaminação: 4 (1) no grupo prMTA *versus* 2 (0) no grupo Controlo Pos., $p < 0,0001$; 4 (1) no grupo Biodentine *versus* 2 (0) no grupo Controlo Pos., $p < 0,0001$] (Fig. 33).

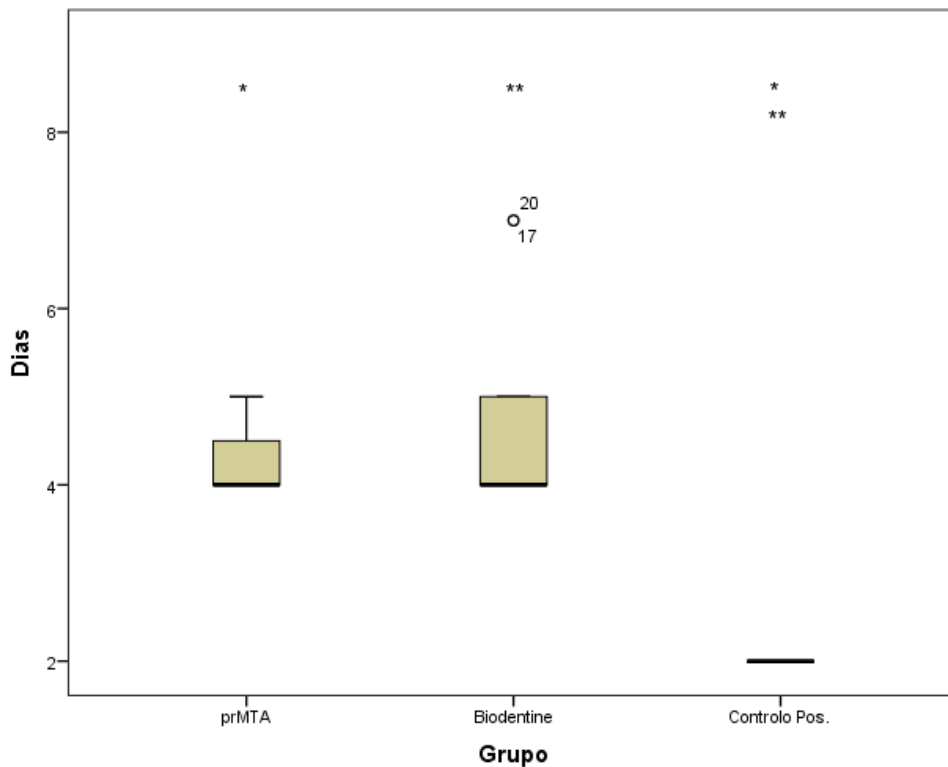


Figura 33- Dia de contaminação por grupo.

* prMTA vs. Controlo Pos.: $p < 0,001$; ** Biodentine vs. Controlo Pos.: $p < 0,001$.

Apesar de o grupo Biodentine ter apresentado um limite máximo superior no dia de contaminação, não houve diferença estatisticamente significativa entre este grupo e o grupo prMTA: (Mediana (IQR) de dia de contaminação: 4 (1) no grupo prMTA *versus* 4 (1) no grupo Biodentine. $P = 0,63$) (Fig. 33).

4- Discussão

A amostra do estudo foi constituída por 32 molares sendo que é um número semelhante a estudos feitos acerca de perfurações de furca utilizando outras metodologias. Sinkar et al. (67) usaram 35 molares para avaliar a capacidade de selamento em perfurações de furca com Biodentine, ProRoot®MTA e Retro MTA. Samuel (40) utilizou 40 molares para comparar a capacidade de selamento de Biodentine e MTA Angelus™ em perfurações de furca.

O modelo de estudo foi baseado no modelo idealizado por Torabinejad. No nosso modelo utilizou-se uma estirpe bacteriana diferente (*E. faecalis*) enquanto que no modelo criado pelo autor foram utilizadas duas estirpes (*P. vulgaris* e *S. epidermis*). Enquanto que no seu estudo foi avaliada a microinfiltração de um material obturador canal, no nosso estudo avaliámos a microinfiltração após a reparação de perfurações de furca. No seu estudo verificou-se a contaminação de 50% das amostras ao fim de 19 dias para *S. epidermis* e 42 dias para *P. vulgaris*.

Num estudo de Padachey et al. (68) foi feita a inoculação de *E. faecalis* durante 90 dias para avaliar a capacidade de ZUT (selador canal) com ou sem gutta-percha resistir à infiltração desta espécie bacteriana, verificando-se que o uso de gutta-percha melhora significativamente a resistência à estirpe bacteriana.

Nos estudos realizados sobre microinfiltração bacteriana existe uma falta de padronização dos modelos experimentais, o que dificulta realizar uma comparação objetiva entre os estudos. Com este trabalho tentamos arranjar um modelo que possa ser replicável e facilite a comparação entre estudos realizados por diferentes investigadores com diferentes materiais em perfurações de furca.

Em relação à esterilização, como foram utilizados materiais que não permitiam ser autoclaváveis, em alta temperatura, como a seringa milimetrada de plástico e a tampa do frasco, optou-se por realizar a esterilização do conjunto formado por estes componentes no sistema de esterilização a baixa temperatura V-PRO com vapor de peróxido de hidrogénio (HPV). O vapor de peróxido de hidrogénio tem-se mostrado eficaz na esterilização de materiais termo sensíveis e tem uma eficácia bem estabelecida contra superfícies contaminadas com esporos bacterianos e outros micróbios (69). Esta é uma tecnologia automatizada que elimina a dependência do operador, sendo usada para a descontaminação ambiental e para melhorar a desinfeção. Funciona através da injeção de peróxido de hidrogénio numa câmara a

vácuo, tornando o ar saturado, até que o peróxido de hidrogénio começa a se condensar nas superfícies (70).

No entanto para confirmar a esterilização, os modelos experimentais foram colocados, durante 3 dias na câmara de fluxo laminar antes de proceder à inoculação com *Enterococcus faecalis*.

Os controlos negativos no estudo permitiram numa primeira fase, fazer a validação do modelo confirmando que não havia nenhuma propagação de microrganismos sem ser pela perfuração de furca. Para reforçar esta situação os dentes foram revestidos, exceto a região da perfuração, com duas camadas de verniz, impermeabilizando o exterior da raiz e certificando que os microrganismos apenas passavam pela região da perfuração de furca e pelo seu material regenerador e não pelos ápices radiculares ou outra via.

Após a realização de todo o protocolo experimental verificámos que o controlo negativo nunca ficou contaminado durante a monitorização verificado pela ausência de turbidez e pela medição da concentração negativa.

Por outro lado, o controlo positivo permitiu assegurar que a proliferação dos microrganismos ocorria conforme a sua curva de crescimento e também nos ajudou a reafirmar que a passagem dos microrganismos só acontecia pela perfuração de furca, reforçando assim a validação do novo modelo.

A utilização de *E. faecalis* foi devido a serem os microrganismos presentes na patologia apical persistente. De serem utilizados em estudos semelhantes, devido à sua fácil contaminação e de terem uma curva de crescimento relativamente rápido. A perfuração de furca é uma complicação que ocorre na prática clínica seja por iatrogenia ou por processo biológico que leva ao comprometimento do ligamento periodontal.

Os estudos escassos sobre a aplicação dos novos cimentos à base de silicato de cálcio, tal como Biodentine, nesta patologia reforçaram a relevância da realização do nosso estudo. Sendo tratada a tempo e com os materiais adequados pode ter bom prognóstico. As opções de tratamento das perfurações de furca são por via cirúrgica e via não cirúrgica sendo que a segunda é mais simples e mais previsível, dado que por via cirúrgica o acesso é difícil com remoção de algum osso alveolar podendo levar à criação de bolsas periodontais (71). Uma das dificuldades na reparação de uma perfuração de furca é a possibilidade de extravasamento do material reparador para os tecidos periapicais circundantes (72,73). Para melhor mimetizar a colocação do material reparador optámos por utilizar uma compressa

durante a restauração da perfuração com as biocerâmicas de modo a que esta simulasse os tecidos perirradiculares.

Na realização das perfurações de furca utilizámos uma broca esférica diamantada #012 de modo a padronizar o diâmetro da perfuração. Assim, tentou-se que o material reparador tivesse aproximadamente a mesma quantidade em todos os dentes levando a que os microrganismos tivessem a mesma espessura de material para conseguir ultrapassar.

O tempo médio de contaminação já era esperado que fosse curto visto que em comparação com um estudo anterior (25) onde mediram o tempo de contaminação em materiais obturadores de canais associado a *S. epidermidis* foi em média de 19 dias, estudo com maior espessura de material a ultrapassar.

Podemos considerar que a diferença de tempo de contaminação entre o nosso estudo e o realizado por Torabinejad et al., se deve à quantidade/ espessura de material restaurador aplicado. Assim sendo, conseguimos explicar esta contaminação pregressa devido à espessura do material que é mais pequena em relação a um material obturador de uma raiz.

Consideramos que em estudos futuros se possa aumentar esta quantidade de material, para as bactérias terem um trajeto maior a percorrer e podermos obter resultados mais diferenciados entre os materiais em estudo.

Para avaliarmos uma curva de crescimento e normalizarmos a quantidade de microrganismos que contaminaram o meio decidimos medir a concentração do meio aquando da deteção de turbidez. Assim, antes da inoculação decidimos regulamentar a concentração DO₆₀₀ de 0,6 para inserirmos nas câmaras pulpares. Colocámos os microrganismos a crescer e esperámos 48h até obtermos esta concentração. Depois inoculámos nos modelos experimentais e após estarem contaminados, retirámos uma amostra do meio e avaliámos a sua concentração. Com isto verificámos que nalguns casos a concentração baixava devido à terminação dos nutrientes. Este feito confirmou-se pela deposição esbranquiçada no fundo dos frascos que equivalia aos microrganismos que já tinham cessado o seu tempo de vida.

De acordo com os resultados expostos na secção de cima podemos referir que as amostras maioritariamente demoraram 4 dias a ficarem contaminadas tanto nas reparações com ProRoot®MTA como com Biodentine.

O tamanho das zonas de inibição depende de dois fatores: da toxicidade do material para determinadas bactérias e da capacidade do material para difundir através do

meio. Por sua vez, a difusibilidade é afetada pela hidrofobicidade do material, pela taxa de liberação de matriz em que é colocado e do tamanho (74).

A propriedade antibacteriana do MTA é devido à presença de óxido de cálcio que forma hidróxido de cálcio em contacto com a água (75).

Quanto à atividade antimicrobiana de Biodentine, Kharabe et al. sugerem no seu estudo que esta biocerâmica tem atividade contra aeróbios e anaeróbios facultativos (62), sendo que Bhavana et al. dizem que o efeito antimicrobiano de Biodentine é maior quando comparado com ProRoot®MTA ou com cimento de ionómero de vidro (76).

Quanto à atividade antimicrobiana do MTA Ryan et al. através de discos de difusão mostraram que ProRoot®MTA é eficaz contra *S. mutans*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* e *P. gingivalis*, mas não contra *E. faecalis* (77).

Apesar de MTA ter sido o “gold standart” para reparações de furca devido à sua previsível regeneração do ligamento periodontal (78) é de reforçar novamente que as suas principais desvantagens na prática clínica incluem o potencial de descoloração, importante em dentes anteriores, o manuseamento onde pode haver degradação do material até ao seu endurecimento, o tempo de endurecimento prolongado, preço elevado, dificuldade de remoção e presença de elementos tóxicos na sua composição (79, 80, 81, 82).

Biodentine apresenta algumas melhorias das características do MTA tais como melhor manuseamento, tempo de endurecimento relativamente rápido (12 minutos), diminuição da porosidade em relação ao MTA e maior estabilidade da cor (57).

Uma propriedade importante que também pode justificar os nossos resultados é a adaptação marginal ou capacidade de selamento. Raskin et al. denotam no seu estudo que Biodentine apresenta uma adequada adaptação marginal tanto na interface de esmalte como na de dentina (83). Também Ravichandra et al. e Soundappan et al. nos seus estudos que compararam esta propriedade com ProRoot®MTA e cimento de ionómero de vidro concluíram que Biodentine é o que apresenta melhor adaptação marginal (84, 85). Tsesis et al. indicaram que quanto à profundidade de penetração de bactérias em túbulos dentinários Biodentine comportava-se de maneira semelhante ao ProRoot®MTA e IRM™, no entanto Biodentine aduziu menos viabilidade das bactérias colonizadas (86). Estes resultados corroboram os nossos resultados, explicando que também esta propriedade pode ter ajudado a que Biodentine demorasse mais tempo que ProRoot®MTA a ficarem todas as amostras contaminadas, uma vez que ao

apresentar melhor capacidade de selamento as bactérias poderão demorar mais para percorrer a espessura do material reparador. No entanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois materiais.

O tempo de presa é outro aspeto importante já que, como referido anteriormente, Biodentine apresenta na sua composição um acelerador que faz com que o tempo de presa seja menor que no MTA. Isto perfaz com que haja menor possibilidade de perda parcial do material reparador havendo melhores resultados na regeneração e adaptação marginal (55).

No tratamento não cirúrgico da perfuração de furca existem estudos que indicam que há em média 70% de casos de sucesso sendo que os dentes da maxila são mais propícios a obter bom prognóstico. A utilização de biocerâmicas como MTA ou Biodentine também aumentam a probabilidade de sucesso clínico (73).

Realizando este estudo *in vitro* tentámos mimetizar as condições clínicas, mas existem alguns aspetos difíceis de replicar. Os microrganismos aplicados foram todos controlados em laboratório no que confere à concentração e qualidade. Na cavidade oral existe sinergismo bacteriano.

Por outro lado, o estudo *in vitro* permite-nos avaliar individualizadamente cada parâmetro não havendo interferências externas como ocorre na cavidade oral.

Para futuros estudos poderemos tentar utilizar seringas e tampas de frascos esterilizáveis em autoclave, uma vez que este método é mais fidedigno que a esterilização através de peróxido de hidrogénio.

Para obter resultados com maior nível de significância é aconselhável aumentar o número da amostra e a espessura do material restaurador.

Podemos considerar que os dois materiais em estudo apresentam capacidade semelhante na resistência à microinfiltração bacteriana. Biodentine apresentou dois casos no qual o tempo de resistência à contaminação foi maior, no entanto sem diferença estatisticamente significativa.

5- Conclusão

Após a realização deste trabalho foi possível validar um novo modelo de microinfiltração bacteriana adaptado às perfurações de furca, tentando assim idealizar um modelo que seja replicável e que facilite a comparação entre estudos. Foi possível avaliar o comportamento de ProRoot®MTA e Biodentine na resistência à microinfiltração bacteriana com *Enterococcus faecalis*.

No presente estudo não se observaram discrepâncias significativas entre as duas biocerâmicas embora Biodentine se tenha mostrado mais resistente à contaminação sem diferenças estatisticamente significativas.

Pudemos aceitar a hipótese nula (H0) não havendo diferença entre a microinfiltração bacteriana em perfurações de furca quando reparadas com Biodentine ou ProRoot®MTA.

Podemos concluir, após a avaliação de um modelo de microinfiltração bacteriana que, tal como referido por Cardoso M, o Biodentine pode ser uma alternativa válida ao ProRoot®MTA na reparação de perfurações de furca.

6- Bibliografia

- 1- COHEN, S; BURNS. Caminhos da Polpa. 7. ed.; Guanabara Koogan, 2000.
- 2- K.M. Hargreaves, S. Cohen. Pathways of the pulp. 10th ed. Mosby 2010;
- 3- Ghivari, S. B., Bhattacharya, H., Bhat, K. G., & Pujar, M. A. Antimicrobial activity of root canal irrigants against biofilm forming pathogens- An *in vitro* study. Journal of conservative dentistry : *JCD*, 2017; 20(3), 147-151.
- 4- Dalmia, S., Gaikwad, A., Samuel, R., Aher, G., Gulve, M., & Kolhe, S. Antimicrobial Efficacy of Different Endodontic Sealers against *Enterococcus faecalis*: An *In vitro* Study. Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry, 2018; 8(2), 104-109.
- 5- Love RM, Millan MDMC. Invasion of Dentinal Tubules by Oral Streptococci Is Associated with Collagen Recognition Mediated by the Antigen I / II Family of Polypeptides. 1997;65(12):5157–64.
- 6- Kina JR, Kina J, Kina EFU, Kina M, Soubhia AMP. Presence of bacteria in dentinal tubules. J Appl Oral Sci. 2008;16(3):205–8.
- 7- Gutmann JL. Historical and Contemporary Perspectives on the Microbiological Aspects of Endodontics. Dentistry Journal. 2018;1–20.
- 8- Jhajharia K, Parolia A, Shetty KV, Mehta LK. Biofilm in endodontics: A review. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2015;5(1):1-12.
- 9- Bouillaguet S, Manoil D, Girard M, Louis J, Gaïa N, Leo S, et al. Root Microbiota in Primary and Secondary Apical Periodontitis. *Front. Microbiol*. 2018;9(October):1–11.
- 10- Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endodontic Topics*. 2018;(November 2004).
- 11- Buschner JH, vanderMei HC. Initial microbial adhesion events: mechanisms and implications. In: Allison DG, Gilbert P, Lappin-Scott HM, Wilson M, eds. *Community Structure and Co-Operation in Biofilms*. Cambridge: Cambridge University Press, 2000: 25–36
- 12- Langeland K. Tissue response to dental caries. *Endod Dent Traumatol*. 1987;3:149–71. [PubMed]
- 13- Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* 1997; 11: 160–167
- 14- Kudiyirickal MG, Ivančáková R. REVIEW ARTICLE ANTIMICROBIAL AGENTS USED IN ENDODONTIC TREATMENT Sodium hypochlorite The antimicrobial solution that has had extensive use in. 2008;51(1):3–12.

- 15-McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 1999;12:147–79
- 16- Saffari F, Sobhanipour MH, Shahravan A, Ahmadrajabi R. Virulence Genes, Antibiotic Resistance and Capsule Locus Polymorphisms in *Enterococcus faecalis* isolated from Canals of Root-Filled Teeth with Periapical Lesions. *Infect Chemother.* 2018;50(4):340–5.
- 17-Wang L, Dong M, Zheng J, Song Q, Yin W, Li J, Niu W. Relationship of biofilm formation and gelE gene expression in *Enterococcus faecalis* recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment. *J Endod* 2011; 37: 631-636.
- 18- Halkai RS, Hegde MN, Halkai KR. Evaluation of *Enterococcus faecalis* adhesion, penetration, and method to prevent the penetration of *Enterococcus faecalis* into root cementum: Confocal laser scanning microscope and scanning electron microscope analysis. *J Conserv Dent.* 2016;19:541–8. [PMC free article] [PubMed]
- 19- Jhajharia K, Parolia A, Shetty KV, Mehta LK. Biofilm in endodontics: A review. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2015;5(1):1-12.
- 20- Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN. “Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation.” *Int Endod J.* 1997; 30(2): 91-5.
- 21- Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *International Endodontic Journal.* 2005;735–42.
- 22- Dumani A, Tanrisever D, Sihay D, Kuzu SB, Yilmaz S, Guvenmez HK. Efficacy of Calcium Hypochlorite with and without Er,Cr: Yttrium, Scandium, Gallium, Garnet Laser Activation on *Enterococcus faecalis* in experimentally infected root canals. *Niger J Clin Pract.* 2019;215–20.
- 23-Gish SP, Drake DR, Walton RE, Wilcox L. “Coronal leakage: bacterial penetration through obturated canals following post preparation.” *J Am Dent Assoc.* 1994;125(10): 1369-72.

- 24- Wu MK, De Gee AJ, Wesselink PR, Moorer WR. "Fluid transport and bacterial penetration along root canal fillings." *Int Endod J*. 1993; 26(4): 203-8.
- 25- Torabinejad M, Ung B, Kettering JD. In Vitro penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. *Journal of endodontics*.1990;16(12):566–9.
- 26- Swanson K, Madison S. "An evaluation of coronal microleakage in endodontically treated teeth. Part I. Time periods." *J Endod*. 1987;13(2): 56-9
- 27- Khayat A, Lee SJ, Torabinejad M. "Human saliva penetration of coronally unsealed obturated root canals." *J Endod*. 1993; 19(9): 458-61.
- 28- Magura ME, Kafrawy AH, Brown CE, Jr., Newton CW. "Human saliva coronal microleakage in obturated root canals: an in vitro study." *J Endod*. 1991;17(7): 324-31.
- 29- Marques M. *Prevenção da Microinfiltração Coronária no Tratamento Endodôntico*. 2008;
- 30- Espaladori MC, Maciel KF, Brito LCN, Vieira LQ, Sobrinho APR. Experimental furcal perforation treated with mineral trioxide aggregate plus selenium: immune response. *Braz Oral Res* [Internet]. 2018;32:e103. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emexb&NEWS=N&AN=624441957>
- 31- Srinivasan R, Bhagabati N, Rajput A, Akhtar S. Non surgical repair of iatrogenic furcal perforation of radix entomolaris. *Med J Armed Forces India*. 2015;71:S422–4.
- 32- Eghbal MJ, Fazlyab M, Asgary S. Repair of a strip perforation with calcium-enriched mixture cement: A case report. *Iran Endod J*. 2014;9(3):225–8.
- 33- Hashem AA, Hassanien EE. ProRoot MTA, MTA-Angelus and IRM used to repair large furcation perforations: sealability study. *J Endod*.2008; 34:59–61.
- 34- Dornelas L, Zaccara IM, Silva JRS, et al. TRATAMENTO DE UMA PERFURAÇÃO COMPLEXA DE FURCA: RELATO DE CASO Treatment of a large furcal perforation : Case Report. *Braz J Periodontol*.2014;24(01).

- 35- Lagisetti, A. K., Hegde, P., & Hegde, M. N. Evaluation of bioceramics and zirconia-reinforced glass ionomer cement in repair of furcation perforations: An *in vitro* study. *Journal of conservative dentistry: JCD*. 2018;21(2), 184-189.
- 36- Cardoso M, dos Anjos Pires M, Correlo V, Reis R, Paulo M, Viegas C. Biodentine for Furcation Perforation Repair: An Animal Study with Histological, Radiographic and Micro-Computed Tomographic Assessment. *Iran Endod J*. 2018;13(3):323-30. Doi: 10.22037/iej.v13i3.19890.
- 37- Unal GC, Maden M, Isidan T. Repair of Furcal Iatrogenic Perforation with Mineral Trioxide Aggregate: Two Years Follow-up of Two Cases. *Eur J Dent [Internet]*. 2010;4(4):475–81.
- 38- Silveira CMM, Sánchez-Ayala A, et. al. Repair of Furcal Perforation with Mineral Trioxide Aggregate: Long-Term Follow-up of 2 cases. *JCDA*. 2008;74(8):729–33.
- 39- Samuel A, Asokan S, Geetha Priya PR, Thomas S. Evaluation of sealing ability of Biodentine™ and mineral trioxide aggregate in primary molars using scanning electron microscope: A randomized controlled in vitro trial. *Contemp Clin Dent*. 2016;7(3):322-5.
- 40- Daniele L. Incappucciamento diretto della polpa con Mineral Trioxide Aggregate: risultati clinici a 10 anni. *G Ital Endod [Internet]*. 2017;31(1):48–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gien.2017.04.003>
- 41- Schönenberger K, Lehnert B, Zehnder M, Indikationsbereiche von MTA, eine Übersicht. *ZO. University of Zurich*. 2004;114(2).
- 42- SUNDQVIST G: Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994; 78: 522–530
- 43- KEISER K, JOHNSON C C, TIPTON D A: Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endodon*. 2000;288–291
- 44- Schönenberger K, Lehnert B, Zehnder M, Indikationsbereiche von MTA, eine Übersicht 2. *ZO. University of Zurich*. 2004;114(2).
- 45- FARACO I M, HOLLAND R: Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent Traumatol*. 2001; 17: 163–166

- 46- ZEHNDER M, KOSICKI D, LUDER H, SENER B, WALTIMO T. Tissue dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94: 756–62
- 47-SHEEHY E C, ROBERTS G J: Use of calcium hydroxide for apical barrier formation and healing in non-vital immature permanent teeth: a review. *Br Dent J.* 1997; 183: 241–246
- 48-SHABAHANG S, TORABINEJAD M, BOYNE P P, ABEDI H, MCMILLAN P: A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. *J Endod.* 1999;25: 1–5
- 49- Lima LVP, Cardoso FP, Brito LCN, Vieira LQ, Ribeiro SAP, Rezende TMB. Experimental Furcal Perforation Treated with MTA: Analysis of the Cytokine Expression. *Braz. Dent. J.* [Internet]. 2015 Aug [cited 2019 Feb 01]; 26(4): 337-341.
- 50- Aggarwal V, Singla M, Miglani S, Kohli S. Comparative evaluation of push-out bond strength of ProRoot MTA, Biodentine, and MTA Plus in furcation perforation repair. *J Conserv Dent.* 2013;16(5):462-5.
- 51- Koubi G, Colon P, Franquin J, Hartmann A, Richard G, Faure M. Clinical evaluation of the performance and safety of a new dentine substitute, Biodentine, in the restoration of posterior teeth — a prospective study. *Clin Oral Invest.* 2013;243–9.
- 52- Pawar AM, Kokate SR, Shah RA. Management of a large periapical lesion using Biodentine(™) as retrograde restoration with eighteen months evident follow up. *J Conserv Dent.* 2013;16(6):573-5.
- 53- About I, Laurent P, Tecles O. Bioactivity of Biodentine: a Ca₃SiO₅-based dentin substitute. *J Dent Res.* 2010; 89 (Spec Iss B): abstract number 150
- 54- Butt N, Talwar S, Chaudhry S, Nawal RR, Yadav S, Bali A. Comparison of physical and mechanical properties of mineral trioxide aggregate and Biodentine. *Indian J Dent Res.* 2014;25(6):692-697.
- 55- Kaur M, Singh H, Dhillon JS, Batra M, Saini M. MTA versus Biodentine: Review of Literature with a Comparative Analysis. *J Clin Diagn Res.* 2017;11(8): ZG01-ZG05.

- 56- Camilleri J. Investigation of Biodentine as dentine replacement material. *J Dent.* 2013;41(7):600-610.
- 57-Grech L, Mallia B, Camilleri J. Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dent Mater.* 2013;29(2): e20-e28.
- 58- Aggarwal V, Singla M, Miglani S, Kohli S. Comparative evaluation of push-out bond strength of ProRoot MTA, Biodentine, and MTA Plus in furcation perforation repair. *J Conserv Dent.* 2013;16(5):462-465.
- 59- Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D, Gonçalves M, Tanomaru JM, Duarte MAH, al. et. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater.* 2013;29(5):580-593
- 60- Yoldaş SE, Bani M, Atabek D, Bodur H. Comparison of the potential discoloration effect of Bioaggregate, Biodentine, and White Mineral Trioxide Aggregate on bovine teeth: in vitro research. *J Endod.* 2016;42(12):1815-1818.
- 61- Rodrigues EM, Gomes-Cornélio AL, Soares-Costa A, Salles LP, Velayutham M, RossaJunior C, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. An assessment of the overexpression of BMP-2 in transfected human osteoblast cells stimulated by mineral trioxide aggregate and Biodentine. *Int Endod J.* January 2017: [Epub ahead of print].
- 62- Kharabe V, Baliga S, Thosar N, Gaikwad U. Antimicrobial efficacy of biodentine against various micro-organisms - an in vitro study. *Int J Res Dent.* 2014;4(1):33-43.
- 63- Özyürek T, Demiryürek EÖ. Comparison of the antimicrobial activity of direct pulpcapping materials: Mineral trioxide aggregate-Angelus and Biodentine. *J Conserv Dent.* 2016;19(6):569-572.
- 64- Pollard BK, Weller RN, Kulild JC. "Standardized technique for linear dye leakage studies: immediate versus delayed immersion times." *Int Endod J.* 1990; 23(5): 250-3
- 65- Barrieshi KM, Walton RE, Johnson WT, Drake DR. "Coronal leakage of mixed anaerobic bacteria after obturation and post space preparation." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997;84(3): 310-4.

- 66- Lane, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, 1991, pp. 115–175. E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: Wiley.
- 67- Sinkar RC, Patil SS, Jogad NP, Gade VJ. Comparison of sealing ability of ProRoot MTA, RetroMTA, and Biodentine as furcation repair materials: An ultraviolet spectrophotometric analysis. *J Conserv Dent*. 2015;18(6):445-448.
- 68- Padachey N, Patel V, Santerre P, Cvitkovitch D, Lawrence HP, Friedman S. "Resistance of a novel root canal sealer to bacterial ingress in vitro." *J Endod*. 2000 26(11): 656-9.
- 69- Goyal SM, Chander Y, Yezli S, Otter JA. Evaluating the virucidal efficacy of hydrogen peroxide vapour. *J Hosp Infect [Internet]*. 2014;86(4):255–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2014.02.003>
- 70- Otter JA, Yezli S, Perl TM, Barbut F, French GL. The role of 'no-touch' automated room disinfection systems in infection prevention and control. *J Hosp Infect* 2013;83:1e13.
- 71- Tsatsas D V, Meliou HA, Kerezoudis NP. Sealing effectiveness of materials used in furcation perforation in vitro. *Int Dent J*. 2005;55(3):133-141
- 72- Samiee M, Eghbal MJ, Parirokh M, Abbas FM, Asgary S. Repair of furcal perforation using a new endodontic cement. *Clin Oral Investig*. 2010;14(6):653-658.
- 73- Kailing Siew, Angeline H.C. Lee, Gary S.P. Cheung, Treatment Outcome of Repaired Root Perforation: A Systematic Review and Meta-analysis, *Journal of Endodontics*. 2015; Volume 41, Issue 11, Pages 1795-1804, ISSN 0099-2399, <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.07.007>.
- 74- al-Khatib ZZ, Baum RH, Morse DR, Yesilsoy C, Bhambhani S, Furst ML, et al. The antimicrobial effect of various endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1990; 70:784–90. [PubMed] [Google Scholar]
- 75- Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Antibacterial effects of some root end filling materials. *J Endod*. 1995; 21:403–6. [PubMed] [Google Scholar]

- 76- Bhavana V, Chaitanya KP, Gandi P, Patil J, Dola B, Reddy RB. Evaluation of antibacterial and antifungal activity of new calcium-based cement (Biodentine) compared to MTA and glass ionomer cement. *J Conserv Dent*. 2015;18(1):44-46.
- 77- Kim RJ, Kim M, Lee K, Lee D, Shin J. Archives of Oral Biology An in vitro evaluation of the antibacterial properties of three mineral trioxide aggregate (MTA) against five oral bacteria. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2015;60(10):1497–502. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.07.014>
- 78- Holland R, Bisco Ferreira L, de Souza V, Otoboni Filho JA, Murata SS, Dezan E. Reaction of the lateral periodontium of dogs' teeth to contaminated and noncontaminated perforations filled with mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2007;33(10):1192-1197.
- 79- Bogen G, Kuttler S. Mineral Trioxide Aggregate obturation: a review and case series. *J Endod*. 2009;35(6):777-790.
- 80- Boutsoukis C, Noula G, Lambrianidis T. Ex vivo study of the efficiency of two techniques for the removal of mineral trioxide aggregate used as a root canal filling material. *J Endod*. 2008;34(10):1239-1242.
- 81- Ni Chaollai A, Monteiro J, Duggal MS. The teaching of management of the pulp in primary molars in Europe: a preliminary investigation in Ireland and the UK. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2009;10(2):98-103.
- 82- Park J.-B., Lee J.-H. Use of mineral trioxide aggregate in the open apex of a maxillary first premolar. *Journal of Oral Science*. 2008;50(3):355–358. doi: 10.2334/josnusd.50.355. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- 83- Raskin A, Eschrich G, Dejou J, About I. In vitro microleakage of Biodentine as a dentin substitute compared to Fuji II LC in cervical lining restorations. *J Adhes Dent*. 2012;14(6):535-542.
- 84- Ravichandra P V, Vemisetty H, Deepthi K, Reddy S, Ramkiran D, Krishna M, Malathi G. Comparative evaluation of marginal adaptation of Biodentine(TM) and other commonly used root end filling materials - an in vitro study. *J Clin Diagn Res*. 2014;8(3):243-245.

85- Soundappan S, Sundaramurthy JL, Raghu S, Natanasabapathy V. Biodentine versus Mineral Trioxide Aggregate versus Intermediate Restorative Material for retrograde root end filling: an in vitro study. *J Dent (Tehran)*. 2014;11(2):143-149.

86- Tsesis I, Elbahary S, Venezia NB, Rosen E. Bacterial colonization in the apical part of extracted human teeth following root-end resection and filling: a confocal laser scanning microscopy study. *Clin Oral Investig*. March 2017:[Epub ahead of print].