

# Metodologías complementarias para la evaluación de dientes tratados endodónticamente restaurados con pernos prefabricados: revisión narrativa de la literatura

## Complementary methodologies' evaluation of endodontically treated teeth restored with precast posts. A literature review

Otávio Marino dos Santos Neto <sup>1,a</sup>, Ingrid Carneiro Cavalcante Souto <sup>1,a</sup>, Renata Cristina Silveira Rodrigues Ferracioli <sup>1,b</sup>, Rossana Pereira Almeida <sup>1,b</sup>

<sup>1</sup> Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brasil.

<sup>a</sup> Master en Odontología.

<sup>b</sup> Doctorado en Odontología.

### Correspondencia:

Otávio Marino dos Santos Neto: otavio\_marino@usp.br  
Avenida do Café, s/n - Campus da USP - Ribeirão Preto/  
SP - Brasil. CEP: 14040-904  
ORCID: 0000-0002-5220-5409

### Coautores:

Ingrid Carneiro Cavalcante Souto: ingridsouto@usp.br  
ORCID: 0000-0003-0193-0755  
Renata Cristina Silveira Ferracioli: renata@forp.usp.br  
ORCID: 0000-0003-4140-4143  
Rossana Pereira de Almeida: rpa@forp.usp.br  
ORCID: 0000-0002-6931-947X

### Editora:

Antonieta Pérez-Flores  
Universidad de Concepción, Chile

**Conflicto de intereses:** los autores declaran no tener conflictos de interés.

**Fuente de financiamiento:** Autofinanciado.

Recibido: 05/10/20

Aceptado: 01/02/21

Publicado: 01/04/21

### Resumen

La restauración de dientes tratados endodónticamente (RDTE) es una temática en constante estudio, con la finalidad de que se obtengan protocolos clínicos seguros, que puedan mejorar la longevidad de los tratamientos. En los últimos años es creciente la búsqueda por metodologías complementarias a la resistencia de unión, para la evaluación de las RDTE. No obstante, es importante conocer las ventajas y desventajas de cada uno de los métodos complementarios más empleados para evaluar las RDTEs, permitiendo ampliar los conocimientos obtenidos en una investigación. El objetivo de este estudio fue presentar los diferentes métodos utilizados como complementarios a las pruebas de resistencia de la unión y resistencia a la fractura tras una revisión narrativa de la literatura. Se realizó una búsqueda en las bases de datos electrónicas PUBMED, BBO (Biblioteca Dental Brasileña), LILACS (Literatura de Salud de América Latina y el Caribe), SciELO y Medline, utilizando las palabras clave “dientes tratados endodónticamente” y “perno prefabricado”, de 1990 hasta el 2020. De los 360 artículos se excluyeron 295 que no presentaban información relevante para nuestra investigación, donde las metodologías comprendieron pruebas microbiológicas, moleculares, biológicas, metodologías de imagen y métodos de análisis de superficies. Al final de la selección de artículos, se enumeraron las técnicas utilizadas en cada estudio y, a partir de ahí, se realizó una nueva búsqueda bibliográfica, con el objetivo de revisar las técnicas y sus potenciales usos, ventajas y desventajas. Se concluye que las técnicas presentadas son valiosas para incrementar los resultados obtenidos con las pruebas mecánicas en la evaluación de la RDTE con pernos prefabricados.

**Palabras clave:** Endodoncia; Restauración dental permanente; Prótesis dental (fuente: DeCS BIREME).

### Abstract

The restoration of endodontically treated teeth (RETT) is a subject in constant study, in order to obtain safe clinical protocols that can improve treatments longevity. In recent years, the search for complementary methodologies to bond-strength proves has been growing for evaluating RETTE, being important to know the most used complementary methods' advantages and disadvantages to evaluate this. The aim of this study is to present a literature review on complementary methods to bond strength and the fracture strength tests. The articles search was done in databases: PUBMED, BBO (Brazilian

Dental Library), LILACS (Health Literature of Latin America and the Caribbean), SciELO and Medline, using the keywords “endodontically treated teeth” and “prefabricated post” from 1990 to 2020. Out of 360 articles 295 were excluded because they did not present relevant information for this research, since the methodologies included microbiological, molecular, biological tests, imaging methodologies, and surface analysis methods. The techniques used in each selected article were listed, and starting from them, a new bibliographic search was carried out, with the aim of reviewing the techniques and their potential uses, advantages and disadvantages. It was concluded that the presented techniques were valuable to increase the obtained results with the mechanical probes in RETT evaluation with prefabricated posts.

**Keywords:** Endodontics; Dental restoration permanent; Dental prosthesis (source: MeSH NLM).

## Introducción

Los dientes tratados endodónticamente pueden presentarse comprometidos por caries, fracturas, pérdida del esmalte. El tratamiento endodóntico también puede comprometer las propiedades mecánicas, químicas y físicas de estos dientes, dificultando su restauración<sup>1</sup>. Frecuentemente se requiere de un perno para retener la restauración coronal, siendo los pernos prefabricados de fibra de vidrio, los más ventajosos en condiciones donde el remanente coronal favorece la manutención del efecto férula. Además, estos pernos tienen un módulo de elasticidad similar al de la dentina, resultando en distribución uniforme de cargas oclusales en los dientes, a través de la raíz<sup>2,3</sup>.

Los esfuerzos para comprender la relación entre la técnica y el material utilizado para la restauración de dientes tratados endodónticamente (RDTE), a menudo se evalúan mediante pruebas de resistencia de la unión. Estas pruebas se pueden clasificar en macro o micropruebas según el tamaño del área de adhesión, además de clasificarse como estáticas o dinámicas. Las pruebas de resistencia de la unión, que se utilizan con más frecuencia para evaluar la retención de pernos en el conducto radicular, son las técnicas de push-out, microtracción y pull-out<sup>4-6</sup>.

Se han sugerido varios protocolos clínicos para la RDTE. La descontaminación de la dentina radicular es un paso clínico importante previo a la cementación de los pernos prefabricados, con el fin de promover la asepsia del conducto y al mismo tiempo favorecer el proceso de adhesión<sup>7,8</sup>. En este sentido, se evalúa la capacidad de una sustancia en promover la descontaminación, eliminación de smear-layer y, en consecuencia, exponer los túbulos dentinarios. Además, se evalúan nuevos sistemas y técnicas de adhesión tanto en los aspectos de la unión entre las interfaces, como en las interacciones con diferentes superficies. La influencia de los procedimientos de descontaminación y las técnicas adhesivas en su interfaz se evalúa mediante pruebas de resistencia de unión<sup>9,10</sup>.

Actualmente se emplean varias metodologías complementarias para correlacionar la efectividad de protocolos clínicos, utilizados previamente a la cementación de

los pernos prefabricados. Varias técnicas de irrigación y protocolos adhesivos son estudiadas mediante metodologías que evalúan la detección y viabilidad de microorganismos<sup>11,12</sup>, degradación del colágeno y caracterización óptica y físico-química de la superficie<sup>13,14</sup>. Este trabajo tuvo como objetivo describir, tras una revisión narrativa, las técnicas complementarias utilizadas para la evaluación de RDTE, enfocando los análisis microbiológicos, moleculares, biológicos, microscópicos, de imagen y superficie, a través de la discusión de estudios *in vitro* donde fueron utilizadas.

## Revisión narrativa de la literatura actual

Este estudio buscó analizar diferentes metodologías que se pueden aplicar en investigaciones *in vitro* que involucran dientes tratados endodónticamente, que luego serán restaurados. La estrategia de búsqueda fue dividida en dos momentos: en un primer momento fue realizada una búsqueda en las bases de datos electrónicas PUBMED, BBO (Biblioteca Dental Brasileña), LILACS (Literatura de Salud de América Latina y el Caribe), SciELO y Medline, con las palabras clave “dientes tratados endodónticamente” y “perno prefabricado”, donde fueron observadas las metodologías utilizadas para evaluar dientes tratados endodónticamente. La búsqueda fue basada en artículos publicados en el período de 1990 hasta 2020. Se encontró 360 artículos, de los cuales se excluyeron 295 que no presentaban información relevante para la investigación. Fueron incluidos los estudios que presentaban la utilización de técnicas complementarias para la evaluación de RDTE, comprendiendo pruebas microbiológicas, moleculares, biológicas, metodologías de imagen y métodos de análisis físico-químico de superficies. Estudios que utilizaban apenas metodologías mecánicas y de resistencia adhesiva fueron excluidos. En el segundo momento, fue hecha una nueva investigación en las bases de datos, con el objetivo de revisar las técnicas y sus potenciales usos, ventajas y desventajas.

## Estudios microbiológicos

**Cultivo de microorganismos.** Los métodos de cultivo de microorganismos son los más utilizados para la evaluación microbiológica. El método consiste en recolectar los microorganismos del interior del conducto radicular, un procedimiento conocido como muestreo.

Habitualmente, se utilizan limas endodónticas y recogida de material microbiológico con conos de papel absorbente<sup>15</sup>. Sin embargo, la técnica presentada tiene la limitación de no llegar a regiones de difícil acceso, como los canales accesorios, así como no distinguir microorganismos por tercios de la raíz<sup>16</sup>. La muestra obtenida se somete luego a cultivo, involucrando una serie de disoluciones, de manera que el contenido microbiano se siembra en placas que contienen medios de cultivo (por ejemplo, agar) en proporciones similares. Después de la incubación, se produce la formación de colonias visibles y, mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC), se obtienen datos relacionados con el muestreo. El recuento de UFC se puede realizar manualmente o utilizando un software asociado con microscopios. Dentro de sus limitaciones, se reporta el tiempo para obtener los resultados, la necesidad de medios de cultivo, una estricta atención a las condiciones de incubación, que en ocasiones imposibilitan la incubación de algunos microorganismos, como los microorganismos anaerobios<sup>17,18</sup>. Se debe tener en cuenta que un canal que no tiene UFC no es necesariamente un canal estéril<sup>15</sup>.

## Estudios moleculares

**Técnicas de amplificación.** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*) – PCR / PCR en tiempo real

Este método evalúa indirectamente el número total de células, midiendo en tiempo real la amplificación de un fragmento de ADN durante la reacción en cadena de la polimerasa. La sensibilidad de la técnica de PCR se debe a la capacidad de una sola molécula de ADN para, teóricamente, funcionar como molde para la amplificación. De esta forma, un gen ubicado en el genoma como una única réplica puede ser amplificado a partir de un ADN genómico complejo, lo que permite la visualización como una banda discreta, formada por moléculas de ADN, mediante electroforesis en gel de agarosa. La técnica de PCR se puede subdividir en tres etapas: desnaturalización térmica del ADN molde; Anillamiento de oligonucleótidos sintéticos, que inician la reacción de polimerización, en cada una de las hebras del ADN molde; y de cada cebador específico, se polimerizan nuevas cadenas de ADN utilizando sustratos de la reacción de polimerización<sup>19</sup>. El PCR convencional presenta como desventaja el elevado riesgo de contaminación en el manoseo de los productos amplificados, por ejemplo, en una segunda reacción PCR<sup>20</sup>.

Actualmente se ha difundido el uso de la técnica de PCR en tiempo real, una reacción que permite la amplificación y detección del fragmento simultáneamente, sin la necesidad de manipulación de los productos amplificados. Así, la técnica combina la tecnología de amplificación por PCR con la detección del producto en tiempo real, a través del uso de tintes fluorescentes en mismo tubo de reacción<sup>20,21</sup>. La técnica de PCR en tiempo real requiere un termociclador capaz de capturar la fluorescencia y un ordenador con un software específico que

analiza los datos. El software disponible de varios fabricantes presenta diferencias en relación a la capacidad de la muestra, el método de excitación y la sensibilidad total. También existen diferencias entre el procesamiento de datos. La emisión de fluorescencia genera una señal que aumenta en proporción directa a la cantidad de productos de PCR. Los datos de fluorescencia se registran durante cada ciclo y describen la cantidad de producto amplificado<sup>22,23</sup>. Aunque esta técnica sea más específica que el PCR convencional, el tiempo que se lleva para la obtención de resultados, la incapacidad de determinar el tamaño del producto y la incompatibilidad de algunos sistemas fluorogénicos, todavía son desventajas de esta técnica<sup>24,25</sup>.

Las técnicas de PCR convencional y en tiempo real permitieron un avance en el diagnóstico de agentes infecciosos, tras la identificación de microorganismos, genes de virulencia o resistencia. En microbiología, en comparación con los métodos de cultivo, los métodos moleculares tienen la ventaja de detectar microorganismos más complejos que son difíciles de detectar en los métodos de cultivo convencionales, como las bacterias anaerobias Gram negativas. Estas técnicas son consideradas rápidas, sensibles y específicas, pero es necesario un estricto cumplimiento de los métodos involucrados durante su procesamiento<sup>15,26</sup>.

## Técnicas de Digestión Enzimática

**Electroforesis.** PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) es la sigla utilizada para apuntar cualquier técnica de electroforesis, donde se separan grandes fragmentos del ADN por medio de su reorientación en gel, a través de la acción de campos eléctricos alternados. Esta técnica es reconocida como el “Gold Standar” para la identificación de bacterias, hongos y protozoos. Durante la electroforesis las moléculas del ADN se posicionan en paralelo al campo eléctrico, así la dificultad de transposición de la matriz de agarosa en dirección al polo positivo es inversamente proporcional a el tamaño de cada molécula. En la práctica, el gel de agarosa de 0,8% es apropiado para la separación de fragmentos de 0,5 hasta 20-30 kb<sup>27,28</sup>. Las moléculas del ADN son mayores que 50 kb lo que dificultaba la técnica. La solución fue la utilización de una técnica de electroforesis de campo pulsante, que permitió que las moléculas se reorientasen con mayor facilidad independiente de la concentración del gel<sup>29</sup>.

A pesar de ser empleada como una valerosa técnica diagnóstica, hay limitaciones en la técnica que pueden influenciar en la resolución como, composición y concentración del gel de agarosa, solución tampón, tensión eléctrica (voltaje), tiempo del pulso y tiempo de carrera electroforética. Otros factores, como el grado de uniformidad, la fuerza relativa de los campos eléctricos, temperatura y la integridad de la molécula, pueden influenciar en los resultados de la técnica<sup>30</sup>.

## Técnicas de secuenciación

**Secuenciación del gen 16S ARNr.** El gen del ARN ribosómico 16S es altamente conservable y puede usarse en la

formación de árboles filogenéticos o relaciones genéticas<sup>31,32</sup>. Este descubrimiento combinado con la técnica de PCR permitió el análisis de biopelículas a nivel genético. El ARN 16S está presente en casi todas las especies bacterianas, pero con secuencias únicas, lo que permite la discriminación entre especies<sup>33</sup>. Los métodos de amplificación como la secuenciación del ARNr 16s constituyeron un avance en la microbiología diagnóstica, ya que eliminaron la necesidad de técnicas basadas en el cultivo de microorganismos, permitiendo así la identificación de especies de difícil cultivo. Comparando la secuencia de ARNr 16S derivada de la muestra con bases de datos de especies conocidas, es posible realizar la identificación de microorganismos<sup>34</sup>. Una limitación de este método es la baja especificidad para distinguir, por ejemplo, bacterias a nivel de especie, ya que diferentes especies pueden compartir la misma secuencia de ARNr 16S, o las diferencias genómicas pueden ser muy pequeñas (menos del 0,5%). A pesar de ello, esta técnica permitió ampliar la información sobre las biopelículas dentales<sup>35</sup>.

### Técnicas de secuenciación basadas en PCR

**Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización.** La electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (en inglés - *Denaturing gradient gel electrophoresis* - DGGE) es una técnica basada en PCR y electroforesis, utilizada para el análisis de microorganismos. Varios genes marcadores, incluido el ARNr 16S, se amplifican mediante PCR y luego se analizan en un gel desnaturalizante. De esta forma se obtiene un padrón de bandas basado en las características de desnaturalización determinadas por la composición de la secuencia de ADN amplificada. Cada banda observada en el gel DGGE representa una población bacteriana detectada dentro de una comunidad<sup>36</sup>. Por lo tanto, la técnica DGGE puede diagnosticar la complejidad y diversidad de una muestra de biopelícula, permitiendo también la escisión y secuenciación de bandas individuales para permitir la identificación de especies<sup>37,38</sup>. Sin embargo, las diferencias de secuencia superiores a 1 par de bases pueden no separarse en el gel desnaturalizante debido a similitudes en los nucleótidos, que pueden generar características desnaturalizantes similares para dos secuencias diferentes. Para evitar esta limitación, es importante que se realicen la escisión y la secuenciación para confirmar la presencia de especies en una banda individual<sup>35,39</sup>.

### Técnicas de hibridación

**DNA Checkerboard.** La técnica de hibridación DNA-Checkerboard tiene la ventaja de detectar varias especies bacterianas en la misma muestra. Puede ser considerada rápida, sensible y económica, superando el cultivo de microorganismos en varios aspectos, como la pérdida de viabilidad durante el transporte, el problema de enumerar y especificar microorganismos que son difíciles de cultivar (o incluso no cultivables). Otra ventaja es que se puede utilizar toda la muestra sin dilución ni amplificación (teniendo en cuenta el tamaño total de la muestra), superando los problemas de cuantificación

impuestos por la dilución en serie o por los procedimientos de amplificación por PCR. Esta técnica obtiene datos cuantitativos que son importantes en investigaciones relacionadas con la infección microbiana donde se propone reducir la expresión de microorganismos, sin embargo a pesar de su precisión no permite evaluar la viabilidad de estos microorganismos<sup>40</sup>.

### Estudios biológicos

**Zimografía.** Las metaloproteinasas de la matriz (MMP) son endopeptidasas dependientes de  $Ca^{2+}$  estructural y funcionalmente y endopeptidasas que contienen  $Zn^{2+}$  que degradan la matriz extracelular (MEC) y las proteínas del tejido conectivo<sup>41,42</sup>. La detección de MMP se puede realizar mediante varias técnicas, siendo la zimografía la más utilizada, ya que identifica las MMP a través de su degradación y peso molecular, determinando su actividad o latencia, utilizándose utilizado como herramienta para evaluar técnicas y condiciones patológicas<sup>43</sup>. La técnica de zimografía es basada en la separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio sin reducción (SDS - PAGE)<sup>44</sup>. El gel especial de poliacrilamida se produce induciendo la polimerización de acrilamida en presencia del sustrato específico de las MMP de interés. Después de la separación por electroforesis y una etapa de "renaturalización", el gel se incuba a 37°C en  $Ca^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  que contienen tampón optimizado para medir la actividad de MMP en relación con el sustrato específico<sup>45</sup>. Si se realiza con cuidado y se analiza con precisión, la zimografía puede ser una técnica muy valerosa para medir la actividad de MMP en varios sistemas biológicos, como plasma, células, medio de cultivo y extractos de tejido<sup>43,46</sup>.

Aunque la zimografía puede ser un ensayo sensible y cuantificable para analizar la actividad de las MMP, los problemas relacionados con la naturaleza, el origen y la preparación de las muestras, el sustrato en el gel y la distinción entre las formas inactiva y activa de las MMP, pueden comprometer la validez de la técnica y complicar la interpretación de los resultados. Para obtener zimogramas consistentes y confiables, es importante prestar atención a todos los diferentes pasos, incluso la preparación del gel, preparación de la muestra, ejecución y desarrollo de geles y análisis de zimogramas<sup>47</sup>.

**Análisis colorimétrico.** El análisis colorimétrico evalúa la capacidad de absorción de luz de los solutos en longitudes de onda específicas. La medición de la luz absorbida afecta la concentración de soluto en una muestra determinada. Su indicación es para determinar la concentración de soluciones coloreadas de forma natural o que adquieren color después de las reacciones. De esta forma, la concentración de las soluciones se puede determinar absorbiendo luz a una longitud de onda determinada. Para esta técnica se utiliza un espectrofotómetro, donde los rayos de luz emitidos se alinean en un colimador, capaz de emitir un haz lineal, puesto que a través del monocromador se interpreta la longitud de onda que afecta a la solución<sup>48-50</sup>. El



análisis cuantitativo se realiza mediante la ley de Lambert-Beer, que establece que la disminución de la intensidad de un haz de luz monocromático en función del espesor del medio absorbente es proporcional a la intensidad del haz incidente. Por lo tanto, esta metodología puede considerarse práctica, sensible y eficaz para evaluar la actividad gelatinolítica en suero, sobrenadantes, productos de lisis celular, entre otras muestras. Se considera más rápida que el zimograma tradicional, lo que permite el análisis de bibliotecas químicas de inhibidores de gelatinasa. La técnica también es capaz de detectar la actividad de MMP-2 a concentraciones reducidas<sup>51</sup>.

## Técnicas microscópicas

**Microscopía confocal.** Los microscopios confocales son uno de los instrumentos más versátiles en microscopía biológica, y ofrecen una modesta ventaja en resolución sobre los microscopios de campo amplio normales, pero su principal ventaja es la capacidad de generar imágenes de alto contraste<sup>52,53</sup>. En un microscopio de campo amplio, las imágenes adquiridas son una superposición de características nítidas del plano focal. Una sola imagen confocal puede ser suficiente para cuantificar todo el espesor de la muestra, lo que permite obtener una serie de imágenes confocales, produciendo datos 2D o 3D, lo que permite la reconstrucción y cuantificación de todo el volumen de la muestra<sup>53</sup>. Cuando se realiza en diferentes planos, como una tomografía, combinada con un programa informático asociado al microscopio, se genera una imagen de alta definición<sup>54</sup>. La microscopía se puede realizar de diferentes formas, como la microscopía confocal de fluorescencia fluorescente, mediante barrido mediante fibra óptica, requiriendo preparaciones específicas para cada modalidad<sup>55</sup>. Aunque este método permite la inspección de componentes marcados con fluorescencia, su limitación es que no es posible obtener imágenes de alta resolución de características ultraestructurales<sup>56</sup>.

**Microscopía electrónica de barrido.** La microscopía electrónica de barrido (MEB) es una herramienta versátil y rápida para la generación de imágenes, análisis de composición, análisis de orientación e identificación de fase del material. La MEB se puede utilizar en muestras orgánicas e inorgánicas con una amplia gama de tamaños, desde nanopartículas hasta las más grandes. Los avances recientes en óptica electrónica y la detección de electrones de señales han mejorado enormemente la utilización de la MEB. Sin embargo, existen diferencias significativas en funcionalidad y rendimiento entre microscopios para MEB<sup>57</sup>. El principio de funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido es el uso de electrones de pequeño diámetro que escanean la superficie de la muestra para transmitir las señales del detector a una pantalla de cátodo. La señal de imagen es el resultado de la interacción del haz incidente con la superficie de la muestra, que es recolectada por detectores adecuados y convertida en una señal de video<sup>58</sup>. La técnica tiene como ventaja el agrandamiento y alta resolución de imágenes, teniendo una definición de 0,2 nanómetros, lo que representa una imagen 1000x más detallada que las

técnicas de fotomicroscopía. Sin embargo, tiene algunas desventajas, como la imposibilidad de analizar especímenes vivos, imágenes en blanco y negro, la presencia de artefactos en la preparación de muestras y los costos involucrados en el procesamiento de muestras y en el mantenimiento del equipo<sup>59</sup>.

**Microscopía electrónica de transmisión.** La microscopía electrónica de transmisión (MET) es una técnica que permite visualizar materiales a través de su morfología, composición química y cristalográfica<sup>60,61</sup>. Las mediciones de energía se obtienen generalmente en condiciones de alto vacío en angstroms y electronvoltios. Además, la técnica permite la visualización de procesos dinámicos cuando la muestra es sometida a un estímulo (MET *in situ*)<sup>62</sup>. De esta forma es posible analizar fenómenos en tiempo real en formato de video, evaluando interacciones entre sólidos, líquidos y gases a nanoescala, correlacionando con las propiedades y aplicación de materiales<sup>63</sup>. La técnica tiene algunas limitaciones debido a las inestabilidades térmicas y mecánicas de la muestra, lo que puede afectar la resolución de la imagen, sumado al hecho de que las muestras son difíciles de preparar debido a su espesor muy delgado<sup>63,64</sup>.

**Perfilometría óptica.** Consiste en aplicar una fuente de luz sobre la muestra analizada. Para las medidas se utiliza un perfilómetro de superficie, que digitaliza las muestras con un rayo láser o una punta de contacto, con un diámetro de 2 a 20  $\mu\text{m}$ <sup>65</sup>. A través de la digitalización se puede generar un mapa completo de la muestra y se puede observar irregularidades de la superficie a escala nanométrica en el rango de aproximadamente 10 nm. Esta técnica es muy útil para medir la rugosidad de materiales y se aplica ampliamente a la investigación dental<sup>66,67</sup>. Sin embargo, presenta una limitación para la evaluación de superficies mojadas. La técnica, cuando realizada con el rayo láser, tiene resultados mucho mejores que con la punta, que está sujeta a la formación de artefactos<sup>68</sup>.

## Técnicas espectroscópicas

**Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X.** La espectroscopia de rayos X de dispersión de energía (EDS), también conocida como microanálisis de fotones electrónicos (EPMA), utiliza un haz de electrones para analizar una muestra. El haz de electrones hace que un electrón se expulse de la capa interna, lo que resulta en la emisión de un fotón de rayos X desde el átomo a medida que un electrón externo se relaja para llenar el agujero en la capa interna. Cada elemento tiene un fotón de rayos X característico igual a la diferencia de energía entre las dos capas, y generalmente se recolecta un espectro dispersivo de energía total en cada punto para el análisis simultáneo de múltiples elementos ( $Z \geq 6$ ). La EDS permite una alta resolución espacial entre 30 y 40 nm y un límite de detección entre 100 e 1000  $\mu\text{g}^{-1}$ <sup>69</sup>. La EDS a menudo se combina con microscopía electrónica de transmisión (MET) o microscopía electrónica de barrido (MEB) para proporcionar información morfológica adicional sobre una muestra, pero a menudo se

colocan secciones delgadas de muestras para el análisis MET. De manera similar a otras técnicas de obtención de imágenes, la preparación de muestras biológicas para EDS generalmente implica congelación y liofilización instantánea para preservar la muestra.

**Espectroscopía Raman.** La espectroscopía Raman es una poderosa técnica espectroscópica que es utilizada para observar modos vibracionales, rotacionales y de baja frecuencia en sistemas moleculares. No es destructivo y requiere poco o ningún pretratamiento de la muestra. Las bandas Raman estrechas permiten la identificación espectral directa y la sustracción de las bandas de fondo sin pérdida de la información analizada. La sensibilidad de la espectroscopía Raman convencional aún no es lo suficientemente alta para su aplicación de rutina debido a la pequeña sección transversal de dispersión Raman. La espectroscopía basada en Raman puede proporcionar información sobre los grupos funcionales de las moléculas analizadas; sin embargo, la identificación de especies puede resultar difícil sin consultar una base de datos o si el compuesto no está presente en la base de datos <sup>70,71</sup>.

**Difracción de rayos X.** La difracción de rayos X (XRD) es una técnica eficaz para caracterizar materiales cristalinos, y es considerada no destructiva. Proporciona información sobre estructuras, fases, orientaciones de cristal, y también parámetros estructurales, como tamaño de grano medio, cristalinidad, tensión y defectos del cristal. Los picos de difracción de rayos X se emiten por interferencia constructiva de un haz de rayos X monocromático extendido en ángulos específicos de cada conjunto de planos de red en una muestra determinada. Las intensidades máximas son determinadas por la distribución de átomos dentro de la red. En consecuencia, el patrón de difracción de rayos X es la huella digital de arreglos atómicos periódicos en un material <sup>72</sup>.

**Espectroscopía de absorción de rayos X.** La espectroscopía de absorción de rayos X (XAS) escanea la energía del haz de rayos X monocromático incidente a través del borde de absorción de un elemento de interés. La estructura del borde de absorción de rayos X cercana se extiende desde unos pocos eV antes del borde de absorción hasta aproximadamente 150 eV por encima del borde y proporciona información sobre el estado de oxidación del elemento. Las estructuras analizadas son generalmente delgadas, con absorción de rayos X entre 150 a 800 eV por encima del borde de absorción, pudiendo mostrar la interferencia entre el fotoelectrón emitido y los átomos vecinos, lo que crea un efecto de retrodispersión <sup>73</sup>. La retrodispersión puede proporcionar información estructural dentro de un radio de aproximadamente 5 Å del átomo de interés. Esta técnica ha sido útil en el estudio de sitios activos de metaloproteínas <sup>74</sup>.

## Otros análisis

**Microtomografía computarizada de rayos X (microCT).** La microtomografía computarizada de rayos X (microCT) se caracteriza por la atenuación de los haces de rayos X, utilizados en la generación de secciones transversales de un material, a través de un conjunto de

proyecciones del plano, permitiendo la reconstrucción de la estructura interna de un objeto <sup>75-77</sup>. La técnica microCT es considerada una de las tecnologías más avanzadas de análisis no destructivo, pudiendo construir imágenes internas en 2D y 3D <sup>78</sup>. Las aplicaciones de microCT son amplias, y su uso permite el análisis de estructuras tridimensionales de varias muestras biológicas y materiales, siendo muy eficiente para visualizar estructuras internas con alta resolución espacial <sup>79</sup>.

**Mojabilidad.** La mojabilidad es la propiedad de un líquido de extenderse sobre una superficie sólida, una importante propiedad de los materiales que muchas veces debe ser evaluada. Cuando ocurre el contacto de líquido con un sólido, es generado un ángulo de contacto, y a través de él se puede clasificar los materiales como no mojante ( $>90^\circ$ ) y mojante ( $<90^\circ$ ) <sup>80</sup>. La mojabilidad de un material se puede cuantificar tras diferentes técnicas:

**Método del goniómetro:** medición directa de la tangente del ángulo de contacto en el punto de contacto trifásico. El equipo consta de una base horizontal donde se monta la muestra sólida o líquida, y una pipeta micrométrica donde se forma la gota de líquido, además de una fuente de luz y un telescopio con ocular. Tiene las ventajas de la sencillez técnica y la dispersión de una pequeña cantidad de líquido, pudiendo leer pequeños sustratos. Como desventajas presenta la posibilidad de impacto de impurezas y la habilidad del operador para que el método sea preciso <sup>81</sup>.

**Método de Wilhelmy:** es un método dinámico, donde el ángulo de contacto no se mide directamente, sino que se estima midiendo la fuerza que actúa sobre la muestra cuando se sumerge o se extrae de un líquido con tensión superficial conocida. La inmersión y eliminación de un líquido determina los ángulos de contacto de avance y retroceso, respectivamente <sup>82</sup>.

**Método DAS (*Drop-Shape Analysis*):** considerado una evolución del método del goniómetro, ya que analiza la tensión superficial de la gota a través de imágenes. Este método produce resultados razonables cuando la gota es pequeña, pero puede ser afectado por gotas más grandes. El ángulo de contacto se determina en base al registro de la gota de líquido en la superficie sólida, formando una curva que se utiliza para la medición <sup>81</sup>.

## Empleo de las técnicas en las investigaciones de los dientes tratados endodóticamente

Las técnicas microbiológicas son técnicas con potencial uso dentro de esta área de estudio. Los dientes tratados endodóticamente son desobturados y el conducto debe recibir sustancias irritantes para la fijación los pernos. Los irrigantes, además de tener acción física y química sobre la dentina, también puede ofrecer un efecto bactericida / bacteriostático. En este contexto, no son frecuentes los estudios en la literatura que hacen un abordaje que correlacione la RDTE con la reducción de microorganismos tras el uso de soluciones irrigantes <sup>83</sup>. Dentro de las técnicas presentadas, la técnica de cultivo de microorganismos

parece ser la más adecuada para este tipo de estudios, asociada o no al uso de técnicas de espectrofotometría para la evaluación de biopelículas<sup>84</sup>. Los estudios que evalúan microbiota en procedimientos de endodoncia, utilizan frecuentemente esta técnica, mostrando cierto grado de confiabilidad en los resultados. Las técnicas moleculares, como PCR y DNA Checkerboard, no detectan la viabilidad de los microorganismos, ya que analizan el material genético. Sin embargo, su uso puede resultar interesante, dado que el uso de sustancias irrigantes puede degradar el material genético<sup>40,85</sup>. En este sentido, la PCR tiene un patrón de detección más alto que los métodos tradicionales de identificación microbiológica y exhibe una mayor especificidad en condiciones optimizadas. Así, el uso de métodos de identificación basados en el conocimiento de la biología molecular puede resultar interesante en la detección de microorganismos endodónticos y factores de virulencia<sup>86-88</sup>. Además las técnicas de electroforesis PFGE<sup>88</sup>, DGGE<sup>89</sup> y secuenciación por 16S ARNr<sup>90,91</sup> se han comprobado como importantes métodos para la detección de microorganismos en el conducto radicular. En esta literatura no se encontraron estudios empleando técnicas moleculares para la detección de microorganismos o evaluación de la efectividad de los protocolos de riego de los conductos, en estas circunstancias es importante señalar para a necesidad de estudios futuros que empleen a estas técnicas en evaluaciones con RDTEs.

Los estudios biológicos son extremadamente importantes en la evaluación de los procedimientos adhesivos y la verificación de las metaloproteinasas de la matriz, que son importantes para la detección de colágeno. La zimografía *in situ*, por ejemplo, se puede realizar para investigar las actividades de metaloproteinasas de la matriz endógena en la capa híbrida, que puede cumplir un papel importante en la fuerza de la unión<sup>92</sup>. Es importante señalar que la evaluación colorimétrica de la actividad total de las MMP vinculadas a la matriz de colágeno consiste en un método *in vitro* que no representa con precisión la condición clínica<sup>93,94</sup>. Además, estas técnicas son valiosas para los estudios de protocolos de irrigación y adhesivos y su efecto sobre la degradación del colágeno, que todavía no están presentes en la literatura.

Los exámenes microscópicos se utilizan a menudo para evaluar la superficie de la dentina tratada con sustancias de irrigación y para comprobar si hay defectos en el proceso de cementación. La topografía de una superficie tiene una gran influencia en su desempeño funcional<sup>95</sup>. SEM y microscopía confocal también se utilizan para evaluar la rugosidad de la superficie. La presencia de fibras de colágeno, smear-layer y la evaluación cualitativa de las fracturas después de las pruebas de resistencia de la unión se pueden realizar con éxito utilizando MEB<sup>96,97</sup>. La microscopía confocal es un método útil para comprobar el cemento en los túbulos dentinarios y para comprobar la presencia de microorganismos<sup>83,98</sup>.

Los exámenes espectroscópicos se utilizan para la evaluación química de la superficie tratada con adhesivos o tratamientos de irrigación. La espectrofotometría Raman se puede utilizar para evaluar la estabilidad química de

la dentina frente a diferentes tipos de tratamiento<sup>99</sup>. La EDS por su parte, es un método asociado a menudo al uso de MEB, ya que permite la valoración cualitativa de las superficies tratadas, como, por ejemplo, después de utilizar diferentes protocolos de riego o utilizar láser<sup>100</sup>. Además, la Micro-CT se puede utilizar para evaluar el espesor del cemento y la presencia de huecos, el espesor de la dentina, y para mejorar el procedimiento de remoción de pernos, entre otras aplicaciones<sup>101-103</sup>.

Finalmente, la humectabilidad es otro parámetro importante a analizar, ya que influye directamente en la capacidad de la dentina para ser humedecida por un líquido. Como la humectabilidad de la superficie es un factor crucial para la adhesión, es interesante examinar el efecto de los irrigadores y los protocolos adhesivos acerca de la humectabilidad de la superficie de la dentina. La humectabilidad depende en gran medida de la composición química, la rugosidad y el estado de hidratación y puede verse influenciada por la densidad del túbulo<sup>104,105</sup>.

## Conclusiones

Basado en la descripción de las metodologías y en los estudios que involucraron la RDTE, es posible concluir que estas son importantes herramientas para la contestación de dudas clínicas en este tipo de tratamiento. A través de ellas, se puede evaluar la efectividad de protocolos de irrigación y cementación, añadiendo importantes hallazgos a las pruebas mecánicas frecuentemente utilizadas. De acuerdo con lo que fue planteado, los estudios con RDTE se han concentrado en técnicas microbiológicas de cultivo, técnicas de microscópicas y análisis de la superficie tras evaluaciones microscópicas, de imagen y superficie. Técnicas moleculares y biológicas son considerados de punta para evaluaciones microbiológicas y de la degradación del colágeno, y ya son empleadas en la endodoncia. De esa manera, es importante que en el futuro haya más estudios que involucren a estas técnicas.

## Referencias bibliográficas

- Soares CJ, Santana FR, Silva NR, Preira JC, Pereira CA. Influence of the Endodontic Treatment on Mechanical Properties of Root Dentin. *J Endod.* 2007;33(5):603-606. DOI:10.1016/j.joen.2007.01.016
- Santos-Filho PCF, Veríssimo C, Raposo LHA, Noritomi, MecEng PY, Marcondes Martins LR. Influence of Ferrule, Post System, and Length on Stress Distribution of Weakened Root-filled Teeth. *J Endod.* 2014;40(11):1874-1878. DOI:10.1016/j.joen.2014.07.015
- Veríssimo C, Simamoto Júnior PC, Soares CJ, Noritomi PY, Santos-Filho PCF. Effect of the crown, post, and remaining coronal dentin on the biomechanical behavior of endodontically treated maxillary central incisors. *J Prosthet Dent.* 2014;111(3):234-246. DOI:10.1016/j.prosdent.2013.07.006
- Sirisha K, Ravishankar Y, Ravikumar P, Rambabu T. Validity of bond strength tests: A critical review-Part II. *J Conserv Dent.* 2014;17(5):420. DOI:10.4103/0972-0707.139823



5. Chen W-P, Chen Y-Y, Huang S-H, Lin C-P. Limitations of Push-out Test in Bond Strength Measurement. *J Endod.* 2013;39(2):283-287. DOI:10.1016/j.joen.2012.11.002
6. Sirisha K, Rambabu T, Shankar Y, Ravikumar P. Validity of bond strength tests: A critical review: Part I. *J Conserv Dent.* 2014;17(4):305. DOI:10.4103/0972-0707.136340
7. Sreirekha A, Rashmi K, Hedge J, Lekha S, Rupali K, Reshmi G. An In Vitro Evaluation of Passive Ultrasonic Agitation of Different Irrigants on Smear Layer Removal After Post Space Preparation: A Scanning Electron Microscopic Study. *J Indian Prosthodont Soc.* 2013;13(3):240-246. DOI:10.1007/s13191-012-0151-8
8. Seballos VG, Barreto MS, Abreu R, Machado E, Valandro LF, Kaizer OB. Effect of Post-Space Irrigation with NaOCl And CaOCl at Different Concentrations on the Bond Strength of Posts Cemented with a Self-Adhesive Resin Cement. *Braz Dent J.* 2018;29(5):446-451.
9. Pereira JR, Ghizoni S, Lorenzoni FC, Ramos MB, Só MVR. Push-out bond strengths of different dental cements used to cement glass fiber posts. *J Prosthet Dent.* 2013;110(2):134-140. DOI:10.1016/S0022-3913(13)60353-4
10. Zicari F, Munck J De, Scotti R, Naert I, Meerbeek B Van. Factors affecting the cement – post interface. *Dent Mater.* 2011;28(3):287-297. DOI:10.1016/j.dental.2011.11.003
11. Mamajiwala AS, Sethi KS, Raut CP, Karde PA, Mangale NM. Impact of different platelet-rich fibrin (PRF) procurement methods on the platelet count, antimicrobial efficacy, and fibrin network pattern in different age groups: an in vitro study. *Clin Oral Investig.* 2020;24(5):1663-1675. DOI:10.1007/s00784-019-03022-8
12. Tonini R, Giovarruscio M, Gorni F, Ionescu A, Brambilla E, Mikhailovna IM, et al. In Vitro Evaluation of Antibacterial Properties and Smear Layer Removal/Sealer Penetration of a Novel Silver-Citrate Root Canal Irrigant. *Materials (Basel).* 2020;13(194):1-15.
13. Barcellos DPDC, Farina AP, Barcellos R, Souza MA, Borba M, Bedran-Russo AK, Bello YD, Vidal CMPV, Cecchin D. Effect of a new irrigant solution containing glycolic acid on smear layer removal and chemical / mechanical properties of dentin. *Sci Rep.* 2020;30;10(1):7313. DOI:10.1038/s41598-020-64450-1
14. Baldasso R, Roletto L, Vinicius C, Dornelles R, Patrícia M, Poli M. Evaluation of the effect of four final irrigation protocols on root canal dentin components by polarized light microscopy and scanning electron microscopy. *Microsc Res Tech.* 2017;80(12):1337-1343. DOI:10.1002/jemt.22946
15. Swimberghe R, Coenye T, De Moor R, Meire M. Bio-film model systems for root canal disinfection: a literature review. *Int End J.* 2019;52(5):604-628.
16. Alves RF, Jr FS, Santos AL, Peixoto RS, Ro IN, Rosado AS. Bacterial Community Profiling of Cryogenically Ground Samples from the Apical and Coronal Root Segments of Teeth with Apical Periodontitis. *J Endod.* 2009;35(4):486-492. DOI:10.1016/j.joen.2008.12.022
17. Loesche WJ, Lopatin DE, Stoll J, Poperin NVAN, Hujoel PP. Comparison of Various Detection Methods for Periodontopathic Bacteria : Can Culture Be Considered the Primary Reference Standard ? *J Clin Microbiol.* 1992;30(2):418-426.
18. Bergenholtz G, Dahle G. Advances in the study of endodontic infections : introduction. *EndodTop.* 2004;9(1):1-4. DOI: 10.1111/j.1601-1546.2004.00105.x.
19. Azevedo M, Felipe M, Brígido M, Maranhão A, De-Souza M. *Técnicas Básicas Em Biologia Molecular.* Brasília: Editora Universidade de Brasília; 2003.
20. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *J Mol Endocrinol.* 2005;34(3):597-601. DOI: 10.1677/jme.1.01755.
21. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter MF, Vetter JDC, Wengenack JE, et al. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(1):165-256. DOI:10.1128/CMR.19.1.165-256.2006
22. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction in Sjo. *Mol Aspects Med.* 2006;27(2-3):95-125. DOI:10.1016/j.mam.2005.12.007
23. Novais CM, Pires-alves M. PCR em tempo real. *Rev Biotecnol Ciência Desenvolv.* 2004;33:10-13.
24. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5(2):209-219. DOI:10.1586/14737159.5.2.209
25. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(3):190-212. DOI:10.1111/j.1198-743X.2004.00722.x
26. Lopes SP, Azevedo NF, Pereira MO. Quantitative assessment of individual populations within polymicrobial biofilms. *Sci Rep.* 2018;9494:1-13. DOI:10.1038/s41598-018-27497-9
27. Fangman WL. Separation of very large DNA molecules by gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 1978;5(3):653-665. DOI:10.1093/nar/5.3.653
28. Magalhães VD, Ferreira JC, Barelli C, Darini ALC. Pulsed field gel electrophoresis use in bacteriology – a technical review. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2005;64(2):155-161.
29. Smith CL, Cantor CR. Purification, specific fragmentation, and separation of large DNA molecules. In: *Recombinant DNA Methodology Selected Methods in Enzymology;* 1987:449-467. DOI:10.1016/0076-6879(87)55030-3
30. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ. Strain delineation and antifungal susceptibilities of epidemiologically related and unrelated isolates of *Candida lusitanae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1994;20(3):127-133. DOI:10.1016/0732-8893(94)90106-6
31. Fox G, Stackebrandt E, Hespell R, Gibson J, Maniloff J, Dyer TA. The phylogeny of prokaryotes. *Science.* 1980;209(4455):457-463. DOI:10.1126/science.6771870



32. Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 1987;51(2):221-271. DOI:10.1128/mmbr.51.2.221-271.1987
33. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J Clin Microbiol.* 2007;45(9):2761-2764. DOI:10.1128/JCM.01228-07
34. Do T, Devine D, Marsh PD. Oral biofilms: Molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. *Clin Cosmet Investig Dent.* 2013;5:11-19. DOI:10.2147/CCIDE.S31005
35. Hiyari S, Bennett KM. Dental Diagnostics: Molecular Analysis of Oral Biofilm. *J Dent Hyg.* 2011;85(4):256-263. DOI:10.1055/s-0038-1632965
36. Fischer SG, Lenman LS. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci.* 1983;80(6):1579-1583. DOI:10.1073/pnas.80.6.1579
37. Li Y, Ge Y, Saxena D, Caufield PW. Genetic Profiling of the Oral Microbiota Associated with Severe Early-Childhood Caries. *J Clin Microbiol.* 2007;45(1):81-87. DOI:10.1128/JCM.01622-06
38. Zijng V, Harmsen HJM, Kleinfelder JW, Van Der Rest ME, Degener JE, Welling GW. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis to study bacterial community structure in pockets of periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;18(1):59-65. DOI:10.1034/j.1399-302X.2003.180110.x
39. Jackson CR, Roden EE, Perry F. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Can Fail to Separate 16S rDNA Fragments with Multiple Base Differences. 2000;1(January):49-51.
40. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, JA Haffajee, Uzel NG, et al. Use of checkerboard DNA – DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19(6):352-62. DOI: 10.1111/j.1399-302x.2004.00168.x. 62.
41. Visse R, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Circ Res.* 2003;92(8):827-839. DOI:10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D
42. Benjamin MM, Khalil RA. Matrix Metalloproteinase Inhibitors as Investigative Tools in the Pathogenesis and Management of Vascular Disease. *Exp Suppl.* 2012:209-279. DOI:10.1007/978-3-0348-0364-9\_7
43. Snoek-van Beurden PAM, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques.* 2005;38(1):73-83. DOI:10.2144/05381RV01
44. Murphy G, Crabbe T. Gelatinases A and B. *Methods Enzym.* 1995;248:470-84. DOI: 10.1016/0076-6879(95)48030-7.
45. Hawkes SP, Li H, Taniguchi GT. Zymography and Reverse Zymography for Detecting MMPs and TIMPs. *Methods Mol Biol.* 2010:257-269. DOI:10.1007/978-1-60327-299-5\_16
46. Lombard C, Saulnier J, Wallach J. Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) activities: a review. *Biochimie.* 2005;87(3-4):265-272. DOI:10.1016/j.biochi.2005.01.007
47. Ren Z, Chen J, Khalil RA. Zymography as a Research Tool in the Study of Matrix Metalloproteinase Inhibitors. *Methods Mol Biol.* 2017:79-102. DOI:10.1007/978-1-4939-7111-4\_8
48. Noble JE, Bailey MJA. Chapter 8 Quantitation of Protein. In: *Methods in Enzymology*; 2009:73-95. DOI:10.1016/S0076-6879(09)63008-1
49. Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-254. DOI:10.1006/abio.1976.9999
50. Sapan C, Lundblad R, Price N. Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnol Appl Biochem.* 1999;29(2):99-108.
51. Ratnikov B, Deryugina E, Leng J, Marchenko G, Dembrow D, Strongin A. Determination of Matrix Metalloproteinase Activity Using Biotinylated Gelatin. *Anal Biochem.* 2000;286(1):149-155. DOI:10.1006/abio.2000.4798
52. Foxton RM, Melo L, Stone DG, Pilecki P, Sherriff M, Watson TF. Long-term durability of one-step adhesive-composite systems to enamel and dentin. *Oper Dent.* 2008;33(6):651-657. DOI:10.2341/07-166
53. Jonkman J, Brown CM, Wright GD, Anderson KI, North AJ. Tutorial: guidance for quantitative confocal microscopy. *Nat Protoc.* 2020. DOI:10.1038/s41596-020-0313-9
54. Mannheimer WA. *Microscopia Dos Materiais.* Rio de Janeiro: E-paper; 2002.
55. Brundle C, Evans C, Wilson S. *Encyclopedia of Materials Characterization: Surfaces, Interfaces and Thin Films.* Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1992.
56. Chai WL, Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R. A review of histomorphometric analysis techniques for assessing implant-soft tissue interface. *Biotech Histochem.* 2011;86(4):242-254. DOI:10.3109/10520291003707916
57. Xing Q. Information or resolution: Which is required from an SEM to study bulk inorganic materials? *Scanning.* 2016;38(6):864-879. DOI:10.1002/sca.21336
58. Dedavid BA, Gomes CI, Machado G. *Microscopia Eletrônica de Varredura - Aplicações e Preparação de Amostras - Materiais Poliméricos, Metálicos e Semicondutores.* Porto Alegre: EDIPUCRS; 2007. DOI:10.1017/CBO9781107415324.004
59. Inkson BJ. Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. In: *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods.* Elsevier; 2016:17-43. DOI:10.1016/B978-0-08-100040-3.00002-X
60. Williams D, Carter C. *Transmission Electron Microscopy. A Text Book for Materials Science.* New York: Plenum Press; 1996.
61. Reimer L. *Transmission Electron Microscopy.* (Rodes W, ed.). New York: Springer; 1989.

62. Egerton R. *Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction a TEM, SEM and AEM*. Nova York: Nova York Springer; 2005.
63. Banhart F. *In-Situ Eletron Microscopy at High Resolution*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.; 2008.
64. Hansen TW, Wagner JB. *Environmental Transmission Electron Microscopy in an Aberration-Corrected Environment*. *Microsc Microanal*. 2012;18(4):684-690. DOI:10.1017/S1431927612000293
65. Attin T, Koidl U, Buchalla W, Schaller HG, Kielbassa AM, Hellwig E. Correlation of microhardness and wear in differently eroded bovine dental enamel. *Arch Oral Biol*. 1997;42(3):243-250. DOI:10.1016/0003-9969(06)00073-2
66. Beyer M, Reichert J, Sigusch BW, Watts DC, Jandt KD. Morphology and structure of polymer layers protecting dental enamel against erosion. *Dent Mater*. 2012;28(10):1089-1097. DOI:10.1016/j.dental.2012.07.003
67. Beyer M, Reichert J, Bossert J, Sigusch BW, Watts DC, Jandt KD. Acids with an equivalent taste lead to different erosion of human dental enamel. *Dent Mater*. 2011;27(10):1017-1023. DOI:10.1016/j.dental.2011.07.001
68. Whitehead SA, Shearer AC, Watts DC, Wilson NHF. Comparison of two stylus methods for measuring surface texture. *Dent Mater*. 1999;15(2):79-86. DOI:10.1016/S0109-5641(99)00017-2
69. McRae R, Bagchi P, Sumalekshmy S, Fahrni CJ. *In Situ Imaging of Metals in Cells and Tissues*. *Chem Rev*. 2009;109(10):4780-4827. DOI:10.1021/cr900223a
70. Kneipp K, Kneipp H, Itzkan I, Dasari RR, Feld MS. *Ultrasensitive Chemical Analysis by Raman Spectroscopy*. *Chem Rev*. 1999;99(10):2957-2976. DOI:10.1021/cr980133r
71. Cialla D, März A, Böhme R, Theil F, Weber K, Schmitt M, Popp J. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends. *Anal Bioanal Chem*. 2012;403(1):27-54. DOI:10.1007/s00216-011-5631-x
72. Bunaciu AA, Udriștioiu E gabriela, Aboul-Enein HY. *X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications*. *Crit Rev Anal Chem*. 2015;45(4):289-299. DOI:10.1080/10408347.2014.949616
73. Jansses K, Grieken R Van. *Cultural Heritage Conservation and Environemtal Impact Assessment by Non-Destructive Testing and Micro-Analysis*. London: A.A. Balkema Publishers; 2005.
74. Ide-Ektessabi A. *Applications of Synchrotron Radiation: Micro Beams in Cell Micro Biology and Medicine*. Springer Verlag; 2007.
75. Steppe K, Cnudde V, Girard C, Lemeur R, Cnudde J-P, Jacobs P. Use of X-ray computed microtomography for non-invasive determination of wood anatomical characteristics. *J Struct Biol*. 2004;148(1):11-21. DOI:10.1016/j.jsb.2004.05.001
76. Wernersson ELG, Brun A, Luengo Hendriks CL. Segmentation of Wood Fibres in 3D CT Images Using Graph Cuts. *Lect Notes Comput Sci*. 2009:92-102. DOI:10.1007/978-3-642-04146-4\_12
77. Machado AC, Lima I, Lopes RT. Effect of 3d computed microtomography resolution on reservoir rocks. *Radiat Phys Chem*. 2014;95:405-407. DOI:10.1016/j.radphyschem.2012.12.029
78. Mayo SC, Chen F, Evans R. Micron-scale 3D imaging of wood and plant microstructure using high-resolution X-ray phase-contrast microtomography. *J Struct Biol*. 2010;171(2):182-188. DOI:10.1016/j.jsb.2010.04.001
79. Mizutani R, Suzuki Y. X-ray microtomography in biology. *Micron*. 2012;43(2-3):104-115. DOI:10.1016/j.micron.2011.10.002
80. Adamsom A, Gast A. *Physical Chemistry of Surfaces*. 6th ed. New York: John Wiley & Sons, Inc; 1997.
81. Yuan Y, Lee T. Contact angle and wetting properties. In: Bracco G, Holst B, eds. *Surface Science Techniques*. Springer Series in Surface Sciences.; 2013:3-34.
82. Wälinder M. *Wetting phenomena on wood – factors influencing measurements of wood wettability [doctoral thesis]*. [Stockholm]: Dept. of Manufacturing Systems Wood Technology and Processing, KTH-Royal Institute of Technology, 2000. 62 p.
83. Al-madi EM, Al-Jamie MA, Al-Owaid NM, Almohaimede AA, Al-Owid AM.. Antibacterial efficacy of silver diamine fluoride as a root canal irrigant. 2019;5(5):1-6. DOI:10.1002/cre2.222
84. Albino Souza M, Dalla Lana D, Gabrielli E, Barbosa Ribeiro M, Miyagaki DC, Cecchin D. Effectiveness of final decontamination protocols against *Enterococcus faecalis* and its influence on bond strength of filling material to root canal dentin. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017;17:92-97. DOI:10.1016/j.pdpdt.2016.11.004
85. Janani M, Jafari F, Samiei M, Loftipour F, Nakhllband A, Ghasemi N, Salari T. Evaluation of Antibacterial Efficacy of Photodynamic Therapy vs. 2.5% NaOCl against *E. faecalis*-infected Root Canals Using Real-time PCR Technique. *J Clin Exp Dent*. 2017; 9(4): e539-e544. DOI:10.4317/jced.53526
86. Sakamoto M. Human of *Treponema Periodontitis* so-cranskii by PCR Associated with. *Microbiol Immunol*. 1999;43(5):485-490.
87. Freitas J, Júnior S. A 16S rDNA-based nested PCR protocol to detect *Campylobacter gracilis* in oral infections. *Oral Microbiol*. 2003;17(2):142-146.
88. Zoletti GO, Pereira EM, Schuenck RP, Teixeira LM, Siqueira JF, dos Santos KRN. Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. *Res Microbiol*. 2011;162(2):151-158. DOI:10.1016/j.resmic.2010.09.018
89. Paiva SSM, Siqueira JF, Rôças IN, Carmo FL, Leite DCA, Ferreira DC, Rachid CTC, Rosado AS. Molecular Microbiological Evaluation of Passive Ultrasonic Activation as a Supplementary Disinfecting Step: A Clinical Study. *J Endod*. 2013;39(2):190-194. DOI:10.1016/j.joen.2012.09.014
90. Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, Louzada LM, dos Santos DG, Andreote FD, Gomes BPF. Microbiological analysis of endodontically treated teeth with apical periodontitis before and after endodontic retreatment.

- Clin Oral Investig. August 2020. DOI:10.1007/s00784-020-03510-2
91. Nardello LCL, Amado PPP, Franco DC, Cazares RXR, Nogales CG, Mayer MPA, et al. Next-Generation Sequencing to Assess Potentially Active Bacteria in Endodontic Infections. *J Endod.* 2020;46(8):1105-1112. DOI:10.1016/j.joen.2020.05.004
  92. Comba A, Scotti N, Mazzoni A, Maravic T, Cunha SR, Tempesta RM, et al. Carbodiimide inactivation of matrix metalloproteinases in radicular dentine. *J Dent.* 2019;82:56-62. DOI:10.1016/j.jdent.2019.01.007
  93. Delgado C, Scheffel D, Scheffel R, Pashley D, Hebling J. Redução da atividade proteolítica da dentina após curtos períodos de aplicação de proantocianidina. *Rev Odontol da UNESP.* 2015;44(6):355-359. DOI:10.1590/1807-2577.02115
  94. Bian F, Ruan G, Xu J, Wang K, Wu J, Ren J. Associations of serum citrate levels with knee structural changes and cartilage enzymes in patients with knee osteoarthritis. 2020 Mar;23(3):435-442. DOI: 10.1111/1756-185X.13787.
  95. Richard L. *Characterisation of Areal Surface Texture.* New York: Springer; 2013.
  96. Prabhakaran P, Mariswamy A. A scanning electron microscope evaluation of efficacy of sodium hypochlorite and Allium sativum in smear layer removal in root canals with the use of modified evacuation system: An ex vivo study. *J Conserv Dent.* 2018;21(4):401. DOI:10.4103/JCD.JCD\_373\_16
  97. Allabban MNM, Youssef SA, Nejri AAM, Qudaih MAA. Evaluation of Bond Strength of Aesthetic Type of Posts at Different Regions of Root Canal after Application of Adhesive Resin Cement. *Open Access Maced J Med Sci.* 2019; 30;7(13):2167-2172. DOI:10.3889/oamjms.2019.580
  98. Llena C, Garcia -Gallart M, Forner L, Ferrari M. Root canal adaptation and intra-tubular penetration of three fiber-post cementation systems. *J Clin Exp Dent.* 2018; 1;10(12):e1198-e1204. DOI:10.4317/jced.55208
  99. Lopes FC, Roperto R, Akkus A, Akkus O, Souza-Gabriel AE, Sousa-Neto MD. Effects of different lasers on organic/inorganic ratio of radicular dentin. *Lasers Med Sci.* 2016;31(3):415-420. DOI:10.1007/s10103-015-1862-y
  100. Lopes FC, Roperto R, Akkus A, Silva Sousa YTC, Sousa-Neto MD. Evaluation of chemical and morphological changes in radicular dentin after different final surface treatments. *Microsc Res Tech.* 2018;81(9):973-979. DOI:10.1002/jemt.23060
  101. ArRejaie A, Alsuliman SA, Aljohani MO, Altamimi HA, Alshwaimi E, Al-Thobity AM. Micro-computed tomography analysis of gap and void formation in different prefabricated fiber post cementation materials and techniques. *Saudi Dent J.* 2019;31(2):236-241. DOI:10.1016/j.sdentj.2019.01.001
  102. Chen X, Min Y, Gao Y, Peng L. Microcomputer tomography measurement of minimum residual dentin thickness in mandibular first molars after virtual fiber post placement. *J Prosthet Dent.* 2020;123(3):506-513. DOI:10.1016/j.prosdent.2018.11.018
  103. Arukaslan G, Aydemir S. Comparison of the efficacies of two different fiber post-removal systems: A micro-computed tomography study. *Microsc Res Tech.* 2019;82(4):394-401. DOI:10.1002/jemt.23180
  104. Rosales JI, Marshall GW, Marshall SJ, Watanabe LG, Toledano M, Cabrerizo MA, Osorio R. Acid-etching and Hydration Influence on Dentin Roughness and Wettability. *J Dent Res.* 1999;78(9):1554-1559. DOI:10.1177/00220345990780091001
  105. Hu X, Ling J, Gao Y. Effects of Irrigation Solutions on Dentin Wettability and Roughness. *J Endod.* 2010;36(6):1064-1067. DOI:10.1016/j.joen.2010.03.007