



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN**  
**CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**  
**ÁREA DE BIOQUÍMICA**  
**LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA ORAL**

**“Evaluación del efecto antifúngico de dos biocerámicos endodónticos en  
*Candida albicans*: Estudio *in vitro*”**

**Francisco Alexis Carrasco Urrutia**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO DENTISTA**

**TUTORA PRINCIPAL**  
**Dra. Carla Lozano M.**

**ASESOR EXPERTO**  
**Dr. Alfredo Sierra C.**

**Adscrito a Proyecto PRI-ODO 2021/03 y a Línea de investigación  
acreditada por la DIFO  
Santiago, Chile  
2024**





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN  
CIENCIAS ODONTOLÓGICAS  
ÁREA DE BIOQUÍMICA  
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA ORAL**

**“Evaluación del efecto antifúngico de dos biocerámicos endodónticos en  
*Candida albicans*: Estudio *in vitro*”**

**Francisco Alexis Carrasco Urrutia**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO DENTISTA**

**TUTORA PRINCIPAL  
Dra. Carla Lozano M.**

**ASESOR EXPERTO  
Dr. Alfredo Sierra C.**

**Adscrito a Proyecto PRI-ODO 2021/03 y a Línea de investigación  
acreditada por la DIFO  
Santiago, Chile  
2024**



## **Dedicatoria**

Este trabajo está dedicado a mis padres, que con su amor, paciencia y apoyo incondicional me han brindado la oportunidad de alcanzar mis metas, quienes me inculcaron el valor del esfuerzo y la constancia. A mi hijo, Ariel, por ser la luz de mi vida y mi razón de ser. Este proyecto es para ti, con la esperanza de que encuentres en él la inspiración para seguir tus propios sueños con pasión y dedicación.

## **Agradecimientos**

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que han sido parte fundamental en la culminación de esta etapa tan importante de mi vida. En primer lugar, a mis padres, Doris y Alexis por su incondicional apoyo y amor a lo largo de este camino. Papá, mamá, gracias por ser mi inspiración y por estar siempre presentes, brindándome la fuerza, consejo y la motivación necesarias para superar cada desafío. A mi hijo, quien con su sonrisa y energía me ha dado la razón más grande para seguir adelante y dar lo mejor de mí.

A Emilia, mi novia, gracias por tu paciencia, comprensión y cariño durante estos años de estudio. Has sido un pilar esencial en mi vida, siempre apoyándome en los momentos difíciles y celebrando conmigo cada logro. A mis suegros, por acogerme con tanto afecto y brindarme su apoyo constante.

A la Dra. Carla Lozano y al Dr. Alfredo Sierra Cristancho, quiero expresarles mi más sincero agradecimiento por su valiosa guía, sus consejos y sus enseñanzas a lo largo de este proceso. Su experiencia y dedicación han sido fundamentales para el desarrollo de mi investigación y mi crecimiento académico, convirtiendo cada etapa del trabajo en una experiencia enriquecedora y gratificante.

A mis compañeros, Benja, Exe, Cata y Vale, quienes no solo fueron colegas, sino también grandes amigos a lo largo de este viaje. Compartimos innumerables experiencias, risas y valiosos aprendizajes que siempre llevaré en mi corazón. Gracias por su compañía y apoyo en cada etapa de este camino; su amistad ha sido fundamental en esta travesía.

A cada funcionario, que con su alegría hicieron de mi día a día mas llevadero. Finalmente, agradezco a mi alma mater, la Universidad de Chile que me ha formado no solo como profesional, sino también como persona, brindándome las herramientas y valores que guiarán mi camino en el futuro.

A todos, gracias.

# ÍNDICE GENERAL

<b>1. MARCO TEÓRICO</b>	<b>1</b>
1.1 Introducción	1
1.2 Microbiología oral	2
1.3 Microbiología endodóntica	2
1.4 Levaduras del género <i>Candida</i>	4
1.5 Tratamiento endodóntico	5
1.6 Biocerámicos	6
<b>2. HIPÓTESIS.</b>	<b>9</b>
<b>3. OBJETIVO GENERAL.</b>	<b>9</b>
<b>4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.</b>	<b>9</b>
<b>5. METODOLOGÍA.</b>	<b>10</b>
<b>6. RESULTADOS.</b>	<b>15</b>
<b>6.1 Evaluación antifúngica de biocerámicos en <i>C. albicans</i> en su forma placntónica.</b>	<b>15</b>
6.1.1 Ensayo de difusión en agar:	15
6.1.2 Crecimiento planctónico de <i>C. albicans</i> :	16
<b>6.2 Efecto de los biocerámicos en la formación de biopelículas de <i>Candida albicans</i>.</b>	<b>18</b>
6.2.1 Cuantificación de la viabilidad de <i>Candida albicans</i> .	18
6.2.2 Cuantificación de Hifas.	21
6.2.3 Determinación de la Biomasa de las biopelículas de <i>C. albicans</i> .	23
<b>6.2.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).</b>	<b>25</b>
6.2.4.1 Experimento con Biocerámicos desde el inicio (hasta 48 h):	25
6.2.4.2 Experimento con Biocerámicos desde las 48 h hasta 96 h:	26
<b>7. DISCUSIÓN.</b>	<b>27</b>
<b>7.1 Efecto antifúngico de los biocerámicos en la levadura en su forma planctónica.</b>	<b>28</b>
<b>7.2 Efecto antifúngico de los biocerámicos en la formación de biopelículas de <i>Candida albicans</i>.</b>	<b>30</b>
<b>8. CONCLUSIÓN</b>	<b>35</b>
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.</b>	<b>36</b>
<b>10. ANEXOS.</b>	<b>45</b>

## RESUMEN

**Introducción:** Las infecciones endodónticas persistentes, especialmente las asociadas con *Candida albicans*, son un desafío importante para el endodoncista. Esta levadura puede formar biopelículas en el sistema de canales radiculares, dificultando su eliminación con los tratamientos convencionales. Los biocerámicos endodónticos, como AH Plus® Bioceramic Sealer y BioRoot™ Flow, han mostrado propiedades antimicrobianas y bioactivas, lo que sugiere un posible efecto antifúngico. Este estudio tiene como objetivo evaluar la capacidad antifúngica de estos materiales frente a *C. albicans* en sus formas planctónica y de biopelícula.

**Metodología:** Se realizó un estudio *in vitro* utilizando un aislado clínico oral de *C. albicans*. Se confeccionaron discos biocerámicos de AH Plus® Bioceramic Sealer y BioRoot™ Flow y se compararon con AH Plus® a base de resina, fluconazol y medio de cultivo de levaduras (controles interno, negativo y positivo, respectivamente). Se realizaron ensayos de difusión en agar, crecimiento planctónico, formación/desintegración de biopelículas analizando viabilidad celular, cuantificación de hifas y biomasa. Las biopelículas fueron evaluadas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). El análisis estadístico fue realizado usando T-test y ANOVA ( $p < 0,05$ ) con el programa GraphPad Prism 8.0.

**Resultados:** En ensayos de difusión en agar, los biocerámicos no produjeron halos de inhibición, respecto a fluconazol. En el crecimiento planctónico, los biocerámicos no mostraron efecto antifúngico respecto al control interno y positivo ( $p > 0,05$ ), pero sí se observó inhibición del crecimiento con fluconazol ( $p < 0,05$ ). En la formación de biopelículas, tanto AH Plus® Bioceramic Sealer como BioRoot™ Flow redujeron la viabilidad de *C. albicans* ( $p < 0,05$ ) respecto al control positivo y sólo BioRoot™ Flow disminuyó la formación de hifas y biomasa a las 48 horas de incubación ( $p < 0,05$ ). A las 96 horas de incubación, solo BioRoot™ Flow presentó mayor capacidad para desintegrar biopelículas maduras al disminuir viabilidad, recuento de hifas y biomasa ( $p < 0,05$ ) respecto a AH Plus® Bioceramic Sealer. Las imágenes de MEB revelaron una menor densidad celular e hifas en las muestras tratadas con biocerámicos respecto a los controles.



**Conclusiones:** Aunque los biocerámicos no mostraron un efecto antifúngico en forma planctónica, demostraron capacidad para disminuir la viabilidad de *C. albicans* y desintegrar biopelículas maduras. BioRoot™ Flow fue particularmente efectivo, sugiriendo su potencial uso en el tratamiento de infecciones endodónticas.

**PALABRAS CLAVES:** *Candida albicans*, Biocerámicos, Biopelículas, Obturación de canal radicular, Sellador de canal radicular.

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 Introducción

Las infecciones endodónticas persistentes representan un desafío importante en la práctica odontológica, especialmente cuando están asociadas con microorganismos resistentes y difíciles de erradicar, como las levaduras del género *Candida* (Siqueira & Rôças, 2022). *Candida albicans*, una de las especies más prevalentes del género, puede colonizar el sistema de canales radiculares (SCR) y formar biopelículas mixtas, estructuras que le confieren una alta resistencia frente a tratamientos antimicrobianos convencionales (Mohammadi & Asgary, 2015; Alshanta y cols., 2019). Esta capacidad para adherirse a superficies dentales y formar biopelículas complica su eliminación, incrementando el riesgo de infecciones persistentes y fracasos terapéuticos en el tratamiento de canales radiculares (Ev y cols., 2020).

En los últimos años, los biocerámicos han emergido como materiales prometedores en odontología endodóntica debido a sus propiedades bioactivas, biocompatibles y antimicrobianas (Suwartini y cols., 2022). Estos materiales, como el AH Plus® Bioceramic Sealer y BioRoot™ Flow, se utilizan comúnmente como selladores de canales radiculares, ofreciendo beneficios potenciales como una mejor capacidad de sellado, resistencia a la filtración y efectos antimicrobianos inherentes (Bramante y cols., 2012). Sin embargo, su eficacia específica contra levaduras como *C. albicans* aún no ha sido completamente elucidada, especialmente en comparación con los métodos tradicionales de tratamiento como la obturación de canales radiculares utilizando cementos endodónticos a base de resina.

El presente estudio se propone evaluar el efecto antifúngico de los biocerámicos endodónticos AH Plus® Bioceramic Sealer y BioRoot™ Flow sobre *C. albicans* en dos contextos su forma planctónica y en biopelículas. A través de un enfoque experimental *in vitro*, se busca determinar si estos materiales pueden contribuir eficazmente a la prevención y tratamiento de infecciones endodónticas, especialmente aquellas complicadas por la presencia de esta levadura, mejorando

así los resultados clínicos y prolongando la vida útil de los tratamientos endodónticos.

## **1.2 Microbiología oral**

Los microorganismos están presentes en múltiples ecosistemas, conformando una pieza fundamental en la maquinaria vital de la naturaleza, y gracias a ello convivimos en equilibrio. El cuerpo humano no es una excepción, está habitado por millones de microorganismos que desempeñan una amplia variedad de funciones esenciales, contribuyendo en la homeostasis. Antonie van Leeuwenhoek, en el siglo XVIII, descubrió bacterias en la cavidad oral (Gest, 2004), desde ese momento ésta se ha convertido en un modelo interesante para el estudio de los microorganismos debido a las condiciones microambientales particulares que allí se encuentran y a la gran diversidad de ellos. A pesar de que la cavidad oral es un ecosistema con fluctuaciones naturales de pH, humedad, cantidad de saliva, entre otros, posee una microbiota muy compleja y organizada, que se mantiene en eubiosis y en sintonía con el hospedero (Marsh & Percival, 2006). Cuando se pierde este equilibrio se pueden presentar patologías disbióticas en la cavidad oral como son la caries dental, la gingivitis y también la periodontitis (Liljemark & Bloomquist, 1996; Marsh & Zaura, 2017). Independiente del motivo causante de la disbiosis, ya sea natural o una enfermedad subyacente, la microbiota oral se modifica dinámicamente con la edad, el hábitat, la respuesta inmune del hospedero y con el microambiente circundante (Rosier y cols., 2018). Estos cambios conducen al establecimiento de un microbioma disbiótico y traen como consecuencia problemas en la salud oral, los que ocurren mayormente en personas mayores (Belibasakis, 2018).

### 1.3 Microbiología endodóntica

En ocasiones la enfermedad de caries, el trauma mecánico o físico-químico afecta al complejo dentino pulpar, generando una respuesta inflamatoria que tiene lugar en el interior de la cámara pulpar, la cual es rígida e inextensible, por lo que la presión hidrostática tisular generada hace colapsar los capilares pulpares, provocando una afectación tisular irreversible y generalizada, conocida como pulpitis irreversible, que desemboca finalmente en necrosis pulpar (Bjørndal, 2008). Existen otras vías de filtración hacia la cámara pulpar como la periodontitis marginal o por translocación bacteriana (Bordagaray y cols., 2021), supuesto que actualmente se encuentra en discusión. En estas condiciones se adquiere una pulpa infectada y necrótica, invadida y habitada por microorganismos con características predominantemente anaerobias, los cuales colonizan el interior del SCR, generándose distintos *hábitats* que se caracterizan por presentar cambios en la tensión de oxígeno, gradiente de nutrientes y acidez. Debido a lo anterior, las infecciones endodónticas son de etiopatogenia polimicrobiana predominantemente anaeróbica (Haapasalo y cols., 2003). Sin embargo, se han descrito bacterias anaerobias facultativas, microaerófilas y recientemente levaduras del género *Candida* spp. (Siqueira, 2002; Siqueira & Rôças, 2022).

Las infecciones endodónticas han sido categorizadas de acuerdo con su etiopatogenia en primarias, secundarias y persistentes. Las infecciones endodónticas primarias son causadas en mayor porcentaje por bacterias anaerobias estrictas, que están presentes en la microbiota oral y que invaden la pulpa necrótica. Las infecciones secundarias ocurren cuando el diente ya ha sido tratado endodónticamente y las bacterias aerobias facultativas penetran contaminando el SCR durante el tratamiento, debido a contaminación entre las sesiones odontológicas, fracaso del sellado provisorio o tras el término del tratamiento endodóntico (Sundqvist & Figdor, 2003). Las bacterias más prevalentes en las infecciones endodónticas mencionadas son anaerobias (28%), tales como *Fusobacterium* spp., *Prevotella* spp. y *Porphyromonas* spp.; microaerófilas (18%) encontramos a *Lactobacillus* spp., *Actinomyces* spp. y *Propionibacterium* spp.; aeróbicas (39%) tales como, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp.,

*Enterococcus* spp., el grupo de Enterobacterias y levaduras *Candida* spp., además de microbiota mixta (2,5%) (Sakko y cols., 2016). Por último, las infecciones persistentes, afectan los canales de dientes ya tratados endodónticamente y son producidas por grupos bacterianos que resisten el desbridamiento y desinfección del canal, como por ejemplo, los géneros *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Actinomyces*, además de levaduras como *Candida* spp. (Siqueira, 2002).

#### **1.4 Levaduras del género *Candida***

Las levaduras son microorganismos eucariotas pertenecientes al reino Fungi, algunas de ellas se han identificado como comensales en distintas partes del cuerpo humano, tales como en la piel, cavidad oral, tracto intestinal y aparatos reproductivos femeninos y masculinos. Se han detectado formando parte del microbioma de la cavidad oral, actuando de manera comensal y/o como patógenos oportunistas o patobiontes (Siqueira & Sen, 2004; Patel, 2022). En disbiosis, se han aislado con frecuencia desde lesiones de caries, placa subgingival o desde sacos periodontales e inclusive invadiendo SCR, participando en condiciones como la necrosis pulpar, fomentando el establecimiento de una infección endodóntica primaria (Siqueira & Sen, 2004). Éstas, a su vez, avanzan por el SCR hasta el ápice dentario donde logran establecerse. En el estudio de Kinirons y cols. (1983), se describió que la levadura *C. albicans* se introdujo en los túbulos dentinarios *in vivo* y se demostró que la capa de barro dentinario, producida por la instrumentación, facilitó la introducción del microorganismo, lo cual puede ser explicado debido a que esta levadura tiene alta afinidad por hidroxiapatita, por lo que se le considera una levadura dentinofílica (Cannon y cols., 1995; Nikawa y cols., 2003; Nikawa y cols., 2006; Ev y cols., 2020). Por otro parte, la instrumentación del SCR, genera barro dentinario y una mayor exposición de colágeno (Klotz y cols., 1993; Turk y cols., 2008), favoreciendo la adherencia de la levadura que tiene capacidad de unirse a colágeno de tipo I y II, lo que incrementa su afinidad hacia el barro dentinario (Hagihara y cols., 1988).

Las levaduras, en las lesiones endodónticas, fueron un hallazgo accidental ocurrido en el año 2002, ya que hasta ese año se usaban medios de cultivo no selectivos para hongos-levaduras y por eso no fueron pesquisadas con anterioridad (Egan y cols., 2002). En la actualidad, se ha confirmado la alta prevalencia de levaduras, principalmente del género *Candida* spp. en infecciones endodónticas, tanto primarias como persistentes. Estudios sugieren que de cada 10 infecciones endodónticas, 1 presenta levaduras, sin embargo, en los últimos años, debido al desarrollo de las tecnologías “ómicas” esta cifra puede aumentar, ya que las técnicas de microbiología básica para obtener aislados clínicos se utilizan cada vez menos (Alberti y cols., 2021).

Estudios actuales posicionan a *C. albicans* como el aislado de levadura más prevalente en infecciones endodónticas (Mergoni y cols., 2018; Persoon y cols., 2017). Esta levadura tiene la capacidad de vivir en condiciones muy desfavorables y con recursos limitados, pues posee mecanismos de patogenicidad que le proporcionan mayor adaptabilidad comparada con otros microorganismos. Estos mecanismos son la producción de enzimas hidrolíticas, fosfolipasas, hemolisina, proteinasas, cambio fenotípico y sobrevivencia en condiciones de baja presión parcial de oxígeno (McCullough y cols., 1996; Alshanta y cols., 2019). Uno de los mecanismos de patogenicidad principales es su capacidad de cambio fenotípico, es decir, pasar de la forma levaduriforme (forma ovalada) a una forma filamentosa (hifa). Esto cambio les proporciona alta resistencia a desinfectantes utilizados en el procedimiento de instrumentación del SCR y preparación quimio-mecánica (PQM), como hipoclorito de sodio, hidróxido de calcio y EDTA (Mohammadi & Asgary, 2015; Alshanta y cols., 2019).

### **1.5 Tratamiento endodóntico**

El tratamiento estándar, cuando existe necrosis del tejido pulpar, es la endodoncia, que consta de tres pasos: cavidad de acceso, preparación quimio-mecánica (extracción de la pulpa infectada o necrosada) y obturación de canales radiculares (OCR). Este tratamiento es muy sensible a la técnica y tiene como

objetivo disminuir la cantidad de bacterias y biopelículas bacterianas, mediante la erradicación y destrucción de las mismas, además de modificar las condiciones del SCR para generar un ambiente menos favorable para el crecimiento microbiano (Sakko y cols., 2016). La OCR consiste en el sellado tridimensional del SCR y la finalidad es mantener la salud en los tejidos circundantes periapicales, evitando la infiltración y reinfección. La OCR es realizada mediante diferentes materiales, los cuales son clasificados en materiales en estado sólido (conos de gutapercha) y plásticos (cementos y pastas). Las técnicas de OCR son variadas, en docencia y en clínica el *gold* estándar es la técnica de compactación lateral en frío con gutapercha, la cual ha servido como parámetro para evaluar otras técnicas (Rojas y cols., 2012). También existen nuevas alternativas como sistemas termoplásticos de gutapercha que han otorgado resultados clínicos aceptables.

## 1.6 Biocerámicos

Los biocerámicos son materiales cerámicos, inorgánicos, no metálicos y son utilizados en medicina y odontología. Están compuestos a base de silicato cálcico, alúmina, zirconio, vidrio bioactivo, cerámica de vidrio, hidroxiapatita y fosfato cálcico reabsorbibles, los cuales son fabricados bajo estrictos protocolos en laboratorio. Estos materiales fraguan en contacto con la humedad presente en los tejidos dentales (Espinoza y cols., 2020).

Los biocerámicos se pueden clasificar en bioinertes, los cuales interactúan con los tejidos biológicos (alúmina y zirconio), bioactivos los que no son reabsorbidos, pero sí interactúan con los tejidos biológicos (vidrio, fosfato de calcio e hidroxiapatita) y biodegradables los cuales son solubles y reabsorbibles (Espinoza y cols., 2020).

Los biocerámicos presentan propiedades biológicas y fisicoquímicas. Dentro de las propiedades biológicas podemos mencionar: la biocompatibilidad que es atribuida a su componente fosfato de calcio, que es inorgánico e inocuo para los tejidos dentales, además de propiciar un ambiente para la proliferación de fibroblastos y osteoblastos en su superficie (Huang y cols., 2015). Otra propiedad

biológica es la bioactividad, que corresponde a la capacidad de provocar una respuesta biológica específica y, los biocerámicos al fraguar en presencia de humedad, forman una capa de hidroxiapatita, proceso denominado biomineralización (Silva Almeida y cols., 2017). También tienen propiedades antibacterianas, de las cuales podemos mencionar que forman nanocristales de 1-3 nanómetros, que evitan la adhesión de bacterias en su superficie (Han y cols., 2015), y la producción de hidróxido de calcio que eleva el pH, generando un ambiente básico con sustentividad de hasta 30 días, provocando una continua eliminación bacteriana (Bramante y cols., 2012). Por otro lado, están las propiedades fisicoquímicas, como la fuerza de unión a los tejidos, que para los biocerámicos oscilan entre 1,8 MPa en canales húmedos y 3 MPa en canales secos (Debelian & Trope, 2016). Otras propiedades son: la radiopacidad, la cual es mayor que un espesor de 3 mm de aluminio, por tanto cumple con la norma ISO 6876: 2012 (Abusrewil y cols., 2018); la solubilidad menor al 3% (Norma ANSI/ADA); el tiempo de fraguado que oscila entre 40-120 minutos y varía dependiendo de la cantidad de humedad disponible (Preparation & Camilleri, 2014); la estabilidad dimensional, para la cual los biocerámicos de uso endodóntico experimentan una leve expansión al momento del fraguado, disminuyendo la probabilidad de infiltración marginal (Gandolfi y cols., 2013); la fluidez, la cual es propiciada por el tamaño de partícula; el pH alcalino superior a 12,4 las primeras 24 horas, descendiendo progresivamente hasta el día 28 (Estrela y cols., 2018), y la resistencia a la fractura, tanto a la compresión como a la flexión, muy por encima de otros materiales (Güven y cols., 2013). Los biocerámicos pueden ser clasificados de acuerdo a su comercialización, los cuales pueden ser mezclados por el operador o bien premezclados.

Los biocerámicos tienen distintos usos en odontología como, por ejemplo, reparación de perforaciones, perforaciones de furca, perforaciones laterales, reabsorción radicular, reabsorción radicular interna, reabsorción radicular externa, relleno ortógrado del canal radicular, formación radicular incompleta (formación del tope apical), pulpotomía y revascularización, recubrimiento pulpar y como cemento sellador. El mecanismo de acción antimicrobiano de los cementos biocerámicos es mediante la liberación de iones hidroxilos y el aumento progresivo del pH ya



indicado anteriormente. Este pH alcalino provoca desnaturalización de proteínas de la membrana plasmática, peroxidación de lípidos e inhibición de la replicación del ADN, además actúa como barrera física que restringe el crecimiento bacteriano (Shaik & Reddy, 2017).

Diversos estudios han evidenciado que los cementos biocerámicos tienen capacidad antimicrobiana en *P. gingivalis*, *E. faecalis* y *C. albicans*, sin embargo, al realizar cuantificación microbiana mediante PCR en tiempo real, se determinó que es más efectivo el sellante de hidróxido de calcio (Suwartini y cols., 2022). En otro estudio *in vitro* evaluaron la capacidad antimicrobiana de los biocerámicos AH-Plus, [BC] sealer y Epiphany sellador autograbante, evidenciando que AH-Plus exhibió un halo de inhibición mayor que los otros biocerámicos testeados contra *Staphylococcus aureus* y *C. albicans* (Rathod y cols., 2020); así como también Sanz y cols. (2021) evidenciaron que el biocerámico AH Plus tuvo un efecto antimicrobiano contra *E. faecalis* y *C. albicans*.

Por otra parte, los biocerámicos han demostrado tener impacto positivo en el grado de proliferación celular (López-García y cols., 2020), generando un efecto osteogénico, además de antiinflamatorio. En el estudio de Sanz y cols. (2021) se evaluaron 2 biocerámicos de última generación (Endosecuense y Ceraseal), los cuales demostraron liberar calcio y favorecer la diferenciación y mineralización de células madre del ligamento periodontal, favoreciendo la cicatrización apical. Los cementos biocerámicos se han posicionado como una opción prometedora debido a sus características hidrófilas, estabilidad dimensional, capacidad de sellado, biocompatibilidad, propiedades antibacterianas y fácil uso. Como se mencionó antes, en los últimos años se ha observado alta prevalencia de *C. albicans* en infecciones endodónticas, tanto primarias como persistentes. Esta observación ha motivado nuestro interés en la realización de este estudio, cuyo objetivo es evidenciar la capacidad fungicida o fungistática sobre *C. albicans* de cementos biocerámicos como AH Plus® Bioceramic Sealer y BioRoot™ Flow, aparecidos recientemente en el mercado en presentación premezclado de última generación, y utilizados para obturación permanente del SCR, comparados entre sí y con un cemento endodóntico a base de resina.

## **2. HIPÓTESIS.**

Los biocerámicos, AH Plus® Bioceramic Sealer y BioRoot™ Flow, de uso endodóntico presentan efecto antifúngico sobre *Candida albicans*, tanto en forma planctónica como biopelículas, respecto a un cemento endodóntico a base de resina.

## **3. OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar el efecto antifúngico de dos biocerámicos de uso endodóntico AH Plus® Bioceramic Sealer y BioRoot™ Flow sobre el crecimiento de *Candida albicans* en forma planctónica y como biopelículas, respecto a un cemento endodóntico a base de resina.

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Determinar el efecto antifúngico de dos biocerámicos de uso endodóntico AH Plus® Bioceramic Sealer y BioRoot™ Flow en la forma planctónica de *Candida albicans*, respecto a un cemento endodóntico a base de resina.
- Determinar el efecto antifúngico de dos biocerámicos de uso endodóntico AH Plus® Bioceramic Sealer y BioRoot™ Flow en biopelículas de *Candida albicans*, respecto a un cemento endodóntico a base de resina.

## 5. METODOLOGÍA.

**Tipo de estudio:** Estudio analítico experimental *in vitro*.

**Microorganismos y condiciones de cultivo:** Se utilizó la levadura *Candida albicans* cepa P1-1, la cual se obtuvo de saliva de un niño preescolar con lesión de caries severa (ICDAS código 6) en un proyecto anterior de la Dra. Carla Lozano. La especie se confirmó por métodos bioquímicos y moleculares, mediante PCR y secuenciación (Lozano y cols., 2017). Este aislado clínico se utilizó debido a que esta especie se ha aislado frecuentemente desde lesiones endodónticas presentes en lesiones de caries profundas, como es el caso de los sujetos de donde obtuvimos esta cepa. Por lo tanto este aislado debiese responder similar a una situación clínica. Los cultivos de levadura fueron crecidos en medio Sabouraud-Dextrosa (SD; Becton Dickinson) a 37°C con agitación y en condiciones aeróbicas durante 18 h. Para los ensayos antifúngicos se utilizó cultivos de levadura a una Densidad Óptica (DO) a 600 nm de 0,38, lo que equivale a  $1 \times 10^7$  células/mL.

**Tipos de Biocerámicos:** Se utilizaron los biocerámicos AH Plus® Bioceramic Sealer (Dentsply Sirona) y BioRoot™ Flow (Septodont) para evaluar su efecto antifúngico. Como control positivo se utilizó cultivo de levadura en medio SD, como control interno de los biocerámicos se utilizó AH Plus® a base de resina (Dentsply) y como control negativo se utilizó un disco de fluconazol a una concentración de 25 µg/mL (para ensayo de difusión en agar) y 2 µg/mL (para crecimiento planctónico y biopelículas), según EUCAST, 2002 (disponible en [http://www.escmid.org/sites/index\\_f.aspx?par=2.4](http://www.escmid.org/sites/index_f.aspx?par=2.4)) y An y cols. (2022). También se utilizó como control dimetilsulfóxido (DMSO), ya que se utilizó para disolver y preparar el fluconazol a la concentración requerida. Los biocerámicos mencionados anteriormente se utilizaron debido a que las empresas de cada uno de ellos nos lo regalaron para poder realizar estos ensayos, por lo cual evitamos la compra de estos cuyo valor son superiores a \$80.000 cada uno. Como no contamos con biocerámicos sin capacidad antifúngica, utilizamos medio de cultivo para las levaduras. El uso de AH Plus®, cemento endodóntico a base de resina, fue debido

al conocimiento previo que éste no presentaba actividad antifúngica. Por último, el uso del fluconazol fue debido a que no contamos con un biocerámico con reconocida capacidad antifúngica.

Brevemente, los biocerámicos utilizados en este estudio presentan una composición química de Dióxido de circonio, Silicato tricálcico, DMSO y Carbonato de litio, principalmente, según lo indica el proveedor de cada uno de ellos.

**Preparación de discos de Biocerámicos:** Los discos de los distintos biocerámicos, incluido el control interno, tienen un tamaño estandarizado (8 mm de diámetro), los cuales fueron preparados en moldes de silicona estéril e incubando a 37°C durante 72 h en una atmósfera húmeda y estéril, según está descrito en las instrucciones de los proveedores de éstos y en Weiss y cols. (1996) y en Jeréz-Olate y cols. (2021).

**Determinación de inhibición del crecimiento mediante ensayo de difusión en agar:** se utilizaron alícuotas de cultivos de la levadura crecidos durante la noche a una  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0,5. Se depositaron 100  $\mu\text{L}$  para la formación de un césped en placas de Petri con medio SD suplementado con agar al 1,5%. Paralelamente, los diferentes discos de biocerámicos y sus respectivos controles, fueron dispuestos en esta placa, por duplicado. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 48 h en aerobiosis. Se determinó el diámetro de inhibición (halo de inhibición) del crecimiento de la levadura, formado sobre el césped, mediante una regla y los resultados se expresaron en mm. Estos ensayos se realizaron dos veces de forma independiente.

**Crecimiento planctónico de *Candida albicans*:** Se realizaron curvas de crecimiento de la levadura (hasta fase estacionaria) en medio SD, por triplicado, incorporando los discos de cada biocerámico por separado, el control interno, el control negativo y el control positivo (medio SD). El control negativo (fluconazol) fue añadido a la concentración indicada de 2  $\mu\text{g/mL}$ . El crecimiento de la levadura se expresó en valores de densidad óptica. En cada curva de crecimiento se tomaron 8 puntos cada 2 h y el noveno punto se tomó al día siguiente.

**Formación de Biopelículas de *Candida albicans*:** Para la formación de biopelículas de la levadura se utilizó el protocolo descrito en do Rosario Palma y cols. (2019). Brevemente, se utilizó una placa de cultivo celular de 24 pocillos en los que se depositaron discos de vidrios en el fondo del pocillo (para permitir la visualización por MEB). A estos pocillos se les agregó 100  $\mu$ L de un cultivo de *C. albicans* a una  $DO_{600\text{ nm}}$  de  $0,38 \pm 100 \mu\text{L}$  de medio SD. Posteriormente, se incubaron durante 90 min a  $37^\circ\text{C}$  con agitación suave (30 rpm; para la adhesión inicial). Luego, se aspiraron los 200  $\mu$ L y se lavaron 2 veces cada pocillo con 0,9% de NaCl. Posteriormente, se agregaron a cada pocillo 100  $\mu$ L de Suero Fetal Bovino (SFB; Gibco, para permitir el desarrollo de hifas) y se incubaron durante 2 h con agitación moderada (60 rpm). A las 2 h se disminuyó la agitación a 30 rpm y se continúa a esta velocidad durante 48 h a  $37^\circ\text{C}$  en aerobiosis. A las 24 h de incubación se aspiró todo el líquido y se agregó el mismo volumen de medio SD fresco, sin SFB.

**Determinación de la capacidad de los biocerámicos de formar/desintegrar biopelículas de *Candida albicans*:** El efecto de cada uno de los biocerámicos en la estructura de las biopelículas de levaduras se realizó de dos formas: 1) para determinar si éstos afectan la formación de la biopelícula, los discos de biocerámicos se depositaron en la placa de 24 pocillos con el cultivo de levaduras desde el inicio de la formación de biopelículas; 2) para determinar si los biocerámicos tienen la capacidad de “desintegrar” la biopelícula madura formada, los discos de biocerámicos se depositaron a las 48 h, que corresponde al término de la formación de biopelículas y, luego de remover el medio de cultivo y agregar medio SD fresco más fluconazol y DMSO donde corresponde, las placas se incubaron nuevamente durante 48 h. La capacidad de formar/desintegrar biopelículas de los biocerámicos y su efecto en la estructura fueron visualizados (descripción cualitativa) mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Además, como medidas indirectas del efecto de los biocerámicos en la formación/desintegración de biopelículas de levaduras, se cuantificó viabilidad

celular, recuento de hifas y biomasa, esta última mediante la técnica de cristal violeta.

**Determinación de viabilidad de *Candida albicans* en biopelículas:** Las biopelículas desarrolladas en las placas de cultivo, con los discos de biocerámicos de las distintas marcas, fueron removidas y transferidas a un tubo estéril con 0,9 mL de NaCl al 0,9%. Las biopelículas fueron dispersadas con vórtex a máxima velocidad. Esta solución “original” se diluyó seriadamente en NaCl 0,9% hasta  $10^{-6}$  v/v y se depositaron 100  $\mu$ L de las dos últimas diluciones por duplicado en medio SD suplementado con agar al 1,5%. Las placas fueron incubadas aeróbicamente a 37°C por 48 h para el desarrollo de las colonias. El recuento se expresó en Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) según está descrito en Lozano y cols. (2017).

**Determinación de la capacidad de formación de hifas:** Se realizó como ha sido descrito previamente por do Rosario Palma y cols. (2019). Brevemente, 50  $\mu$ L de cada condición experimental fueron depositados en portaobjetos, cubiertos con cubreobjetos y observadas en un microscopio óptico (Standard 20, Carl Zeiss, Alemania) a una magnificación de 40x. La cuantificación se realizó analizando diez campos microscópicos, por duplicado, a partir de las soluciones “originales” de cada condición experimental y los controles respectivos, obteniéndose el promedio del número de hifas.

**Determinación de biomasa mediante método de Cristal Violeta:** Se realizó según Merrit y cols. (2005) con menores modificaciones. Se retiraron los cultivos de levaduras crecidos en los pocillos de cada condición experimental y los respectivos controles. Luego, se lavaron de 3 veces con agua destilada estéril. Una vez retirada el agua, se agregaron 100  $\mu$ L de cristal violeta (CV) al 0,1% y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró el CV de las placas y se lavaron de 3 veces con agua destilada estéril. Se secaron unos minutos a 37°C y se agregaron 200  $\mu$ L de ácido acético al 30%, incubando por 15 minutos a

temperatura ambiente. Se midió la D.O. a 595 nm y a 3 pocillos vacíos de la placa se agregaron 200  $\mu$ L de ácido acético al 30% como blanco de la medición de D.O.

**Visualización de biopelículas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB):** los discos de vidrio utilizados en los ensayos de formación de biopelículas, en condiciones experimentales y en controles, fueron extraídos del fondo de los pocillos. Posteriormente, éstos fueron observados mediante MEB (Marca JEOL modelo JSM-IT300LV) en la unidad respectiva de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Las imágenes obtenidas fueron analizadas en forma cualitativa.

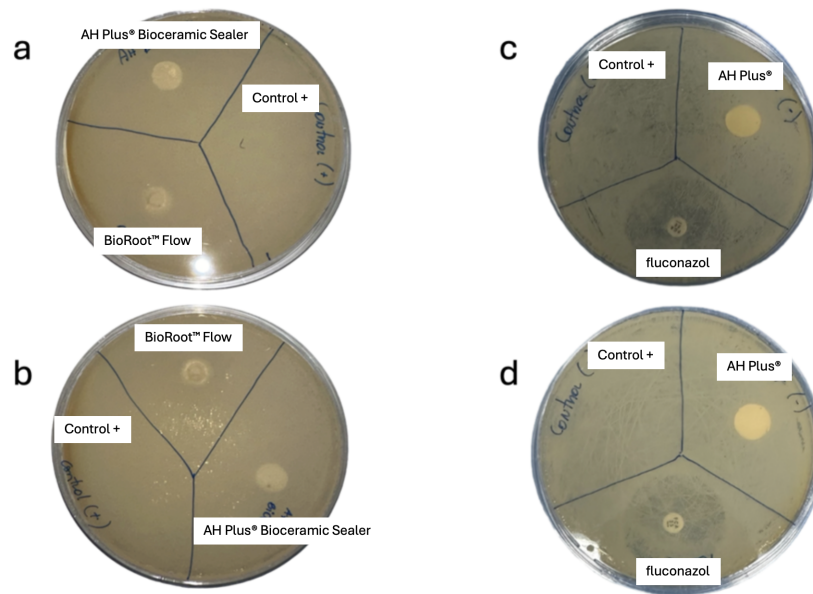
**Análisis estadístico:** Una vez obtenido los datos de todas las variables cuantitativas a analizar en este estudio, se procedió a utilizar el test de Shapiro-Wilk, para determinar si los datos obtenidos presentaban distribución normal o no normal. Si la distribución fue normal se utilizó T-test o ANOVA de uno o dos vías, según sea el caso (estadística paramétrica) y, si los datos no se distribuían normalmente se utilizó estadística no paramétrica, como test de Wilcoxon o Kruskal-Wallis, según corresponda. Se consideró diferencia estadística significativa cuando el valor de p fue menor a 0,05. Todos los análisis fueron realizados con el *software* estadístico GraphPad Prism versión 8.0.

## 6. RESULTADOS.

### 6.1 Evaluación del efecto antifúngico de ambos biocerámicos en cultivos planctónicos de *C. albicans*.

#### 6.1.1 Ensayo de difusión en agar:

En la **Figura 1** se presentan los resultados de los ensayos de difusión en agar, en los cuales se formó un césped a partir de una alícuota de 100  $\mu$ L del cultivo de levaduras en forma planctónica, utilizando 1 y 0,5 unidades de densidad óptica (D.O.) a 600 nm. En ambas D.O. no se observaron halos de inhibición del crecimiento de levaduras, es decir, no hubo efecto antifúngico de los biocerámicos. Sin embargo, sí se evidenciaron halos de inhibición en presencia de fluconazol, cuyo valor promedio obtenido fue  $12 \pm 1,4$  mm. Los datos se muestran en la **Tabla 1**.



**Figura 1: Ensayo de difusión en agar para evaluar actividad antifúngica de los biocerámicos.** a y b) duplicados de placas con disco del biocerámico AH Plus® Bioceramic Sealer (Dentsply Sirona), Control + (medio SD) y disco biocerámico BioRoot™ Flow (Septodont); c y d) duplicados de control + (medio SD), disco AH Plus® a base de resina (Dentsply), disco con fluconazol (control negativo). Los ensayos se realizaron en duplicado en dos experimentos independientes.



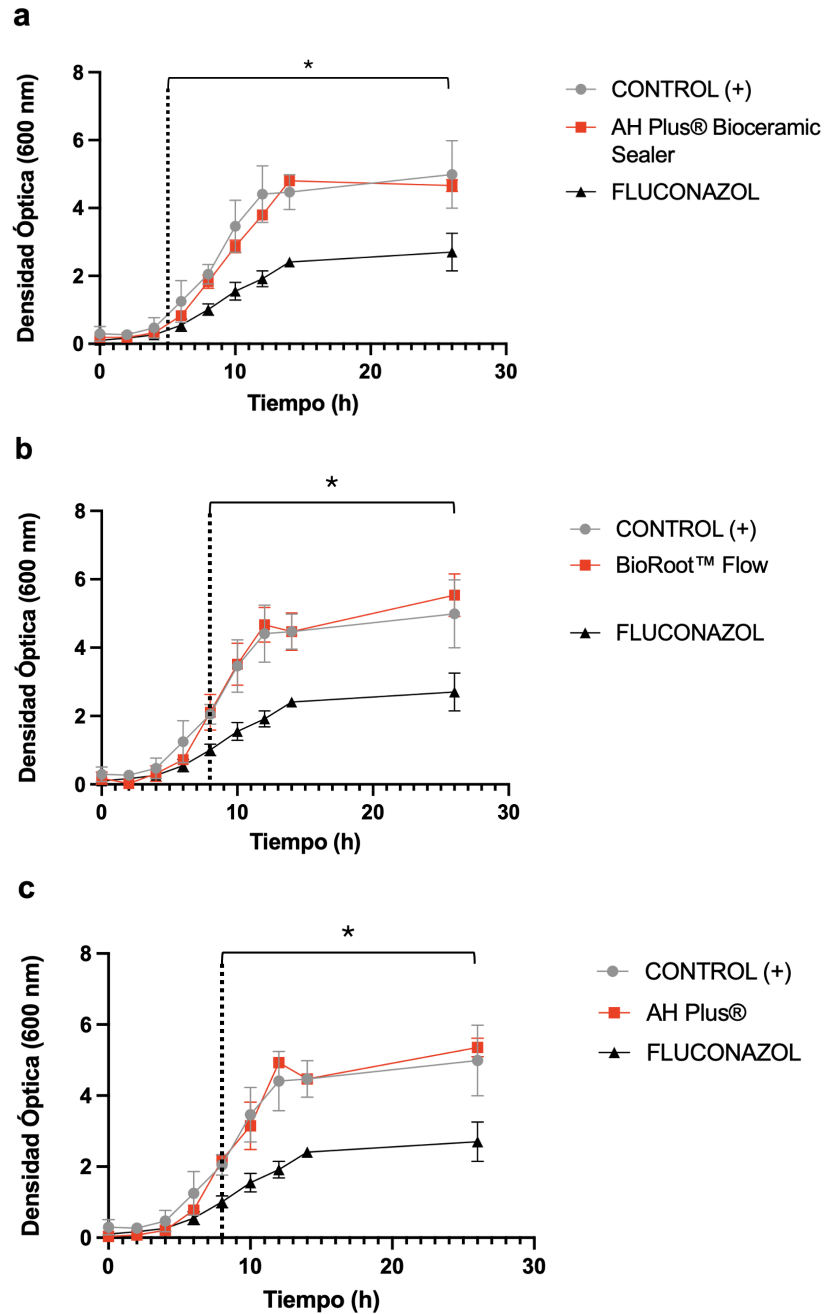
**Tabla 1:** Cuantificación de halos de inhibición en las diferentes condiciones.

<b>Condiciones experimentales</b>	<b>Promedio de halos de inhibición (mm)</b>	<b>DS (mm)</b>
AH Plus® Bioceramic Sealer	0	0
BioRoot™ Flow	0	0
AH Plus® (control interno)	0	0
Fluconazol (control negativo)	12	1,41

DS: desviación estándar.

### **6.1.2 Efecto antifúngico de los biocerámicos sobre el crecimiento de *C. albicans* en forma planctónica:**

En la **Figura 2** se presentan las curvas de crecimiento de la levadura con los biocerámicos AH Plus® Bioceramic Sealer (Figura 2a), BioRoot™ Flow (Figura 2b) y sus respectivos controles interno (Figura 2c), positivo y negativo. Se puede observar que la levadura no presentó cambios en la curva de crecimiento respecto al control positivo, por lo que no habría un efecto antifúngico de los biocerámicos. Con el control negativo que correspondió a fluconazol, se observó efecto antifúngico, evidenciando una disminución significativa del crecimiento de la levadura.



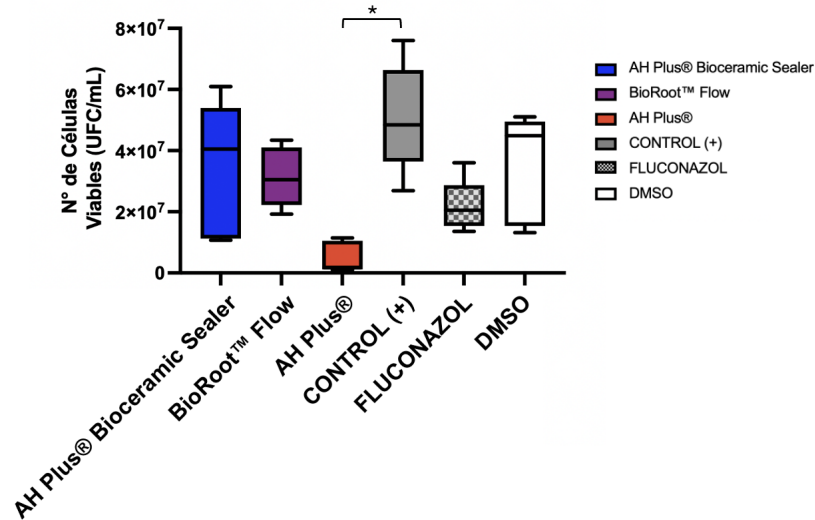
**Figura 2: Evaluación del efecto antifúngico de los diferentes biocerámicos en el crecimiento de la levadura.** a) AH Plus® Bioceramic Sealer con los respectivos controles; b) BioRoot™ Flow con los respectivos controles; c) AH Plus® (control interno) con los respectivos controles. Control positivo: Medio SD; Control negativo: Fluconazol 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de concentración. La línea punteada representa al tiempo en que los datos comenzaron a tener diferencias estadísticas. Test ANOVA  $p < 0,05$ .

## **6.2 Efecto de los biocerámicos en la formación/desintegración de biopelículas de *Candida albicans*.**

### **6.2.1 Cuantificación de la viabilidad de *Candida albicans*.**

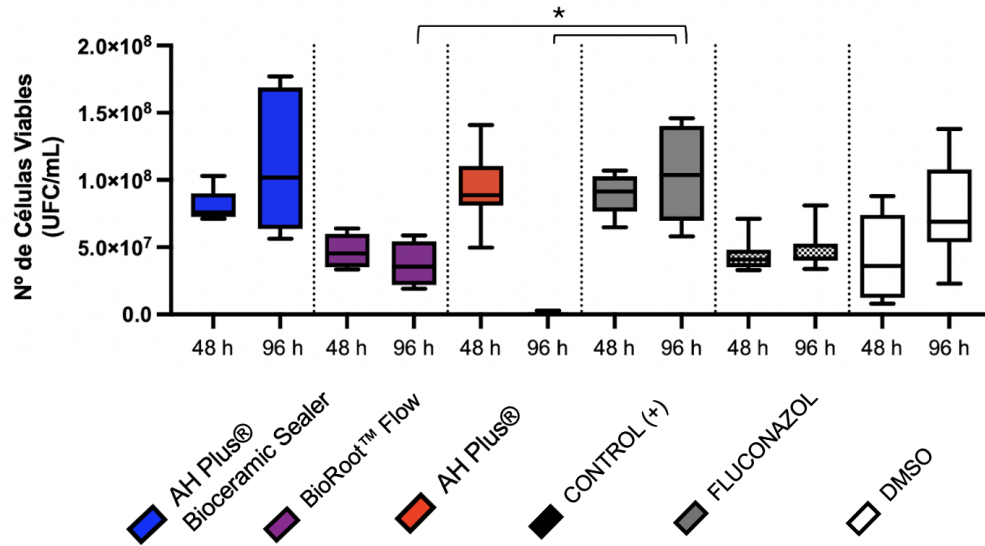
En este experimento se cuantificó la viabilidad celular de la levadura en dos tiempos de formación de biopelículas: a las 48 horas de incubación con los distintos biocerámicos y los respectivos controles, para analizar el efecto de estos en la formación de la biopelícula. Por otro lado, también se cuantificó la viabilidad a las 96 horas de incubación, pero primero se permitió la formación de la biopelícula madura hasta las 48 horas, momento en el cual se agregaron los biocerámicos junto con los controles respectivos. Este ensayo corresponde al efecto de los biocerámicos en una biopelícula madura y establecida.

En la **Figura 3** se representa el recuento viable de la levadura en el ensayo de formación de biopelícula utilizando los biocerámicos desde el inicio de éste (mantenidas durante 48 h). En esta figura se puede apreciar que la condición que tuvo mayor efecto negativo en la viabilidad de la levadura fue AH Plus® (mediana  $1,8 \times 10^6$ ; rango  $1,0 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ ), y hubo diferencias significativas entre AH Plus® y control positivo ( $p < 0,001$ ). En contraste, el AH Plus® Bioceramic Sealer (mediana  $4,1 \times 10^7$ ; rango  $1,1 \times 10^7 - 6,1 \times 10^7$ ) fue con el que se obtuvo el mayor recuento viable en comparación con los controles positivo y negativo.



**Figura 3:** N° de células viables (UFC/mL) de *C. albicans* en las distintas condiciones experimentales durante 48 h de incubación. AH Plus® Bioceramic Sealer (Dentsply Sirona); BioRoot™ Flow (Septodont); AH Plus® a base de resina (Dentsply); Control positivo (medio SD); Control negativo (fluconazol); DMSO (sustancia química con la cual se disolvió el fluconazol). N=4, 2 experimentos independientes en cada una de las condiciones. Test Kruskal-Wallis  $p < 0,05$  y test de Dunn's.

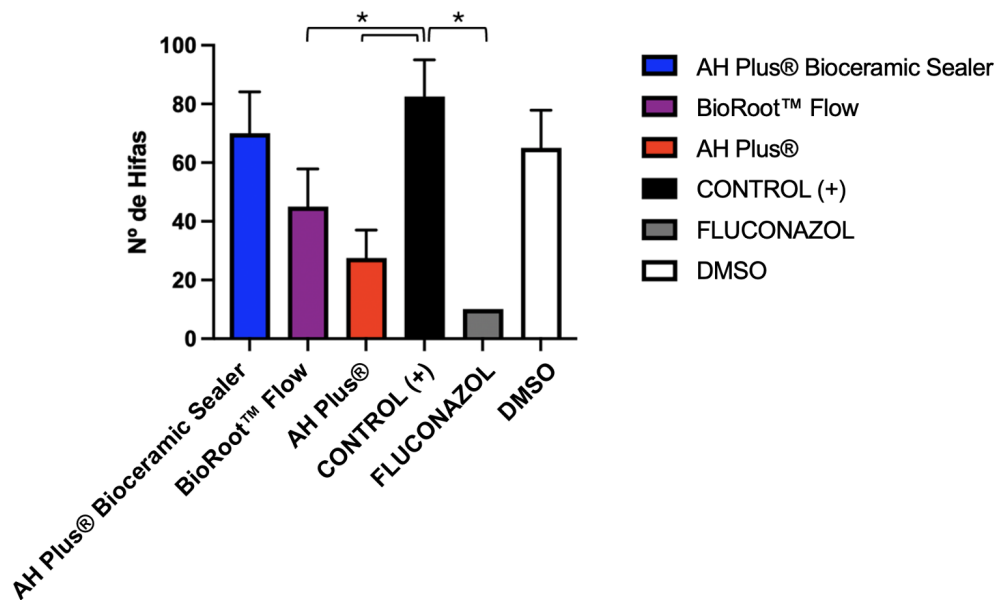
En la **Figura 4** se representa el recuento viable de la levadura en el ensayo de formación de biopelícula a las 48 h, posteriormente se agregaron los biocerámicos y los controles los cuales se mantuvieron por 48 h adicionales (hasta las 96 h). En esta figura se observa que AH Plus® a base de resina mostró efecto negativo en la viabilidad de la levadura a las 96 h (mediana  $1,0 \times 10^5$ ; rango  $0 - 2,9 \times 10^6$ ), seguido de BioRoot™ Flow (mediana  $3,5 \times 10^7$ ; rango  $1,9 \times 10^7 - 5,7 \times 10^7$ ). En contraste, la levadura en la condición AH Plus® Bioceramic Sealer presentó una mediana de  $1,0 \times 10^8$ ; rango  $5,6 \times 10^7 - 1,7 \times 10^8$  por lo que es un mayor recuento viable en comparación con las otras dos condiciones experimentales con cementos endodónticos y no presentó diferencias significativas respecto al control positivo. Por otra parte, hay diferencias significativas entre AH Plus® y control positivo ( $p = 0,001$ ), además de BioRoot™ Flow y control positivo ( $p = 0,049$ ).



**Figura 4: N° de células viables (UFC/mL) de *C. albicans* en las distintas condiciones experimentales, a partir de las 48 h, se agregaron los biocerámicos y controles hasta 96 h de incubación.** AH Plus® Bioceramic Sealer (Dentsply Sirona); BioRoot™ Flow (Septodont); AH Plus® a base de resina (Dentsply); Control positivo (medio SD); Control negativo (fluconazol); DMSO (sustancia química con la cual se disolvió el fluconazol). N=4, 2 experimentos independientes en cada una de las condiciones. Test Kruskal-Wallis  $p < 0,05$  y test de Dunn's.

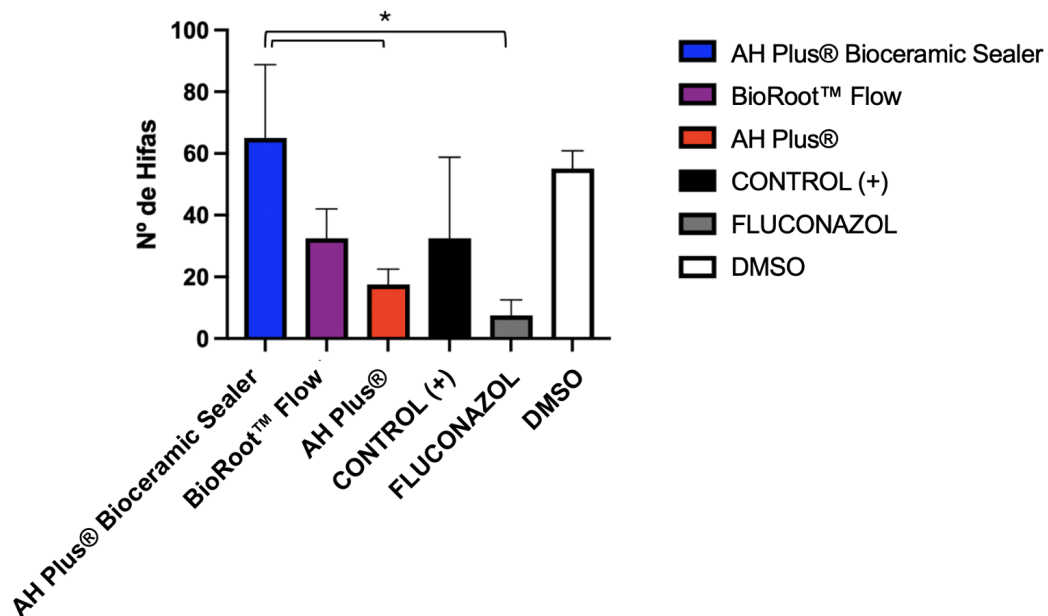
### 6.2.2 Evaluación indirecta del efecto de los biocerámicos en la formación/desintegración de biopelículas mediante cuantificación de Hifas.

Se realizó una cuantificación de hifas de la levadura en dos tiempos de formación de biopelículas, esto es, a las 48 h y 96 h de incubación con los distintos biocerámicos y los respectivos controles (**Figuras 5 y 6, respectivamente**). A las 48 horas de formación de biopelículas, se aprecia que el recuento de hifas fue mayor en el control positivo (promedio  $82,5 \pm 12,58$ ), seguido de AH Plus® Bioceramic Sealer (promedio  $70 \pm 14,14$ ) y DMSO (promedio  $65 \pm 12,9$ ). Por otra parte, las condiciones en que se obtuvo menor recuento de hifas fueron fluconazol (promedio  $10 \pm 0$ ), seguido de AH Plus® (promedio  $27,5 \pm 9,57$ ) y BioRoot™ Flow (promedio  $45 \pm 12,9$ ). Todas las condiciones presentaron diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ), excepto AH Plus® Bioceramic Sealer con control positivo y, la condición control positivo con DMSO ( $p = 0,64$  y  $p = 0,988$ , respectivamente).



**Figura 5: Número de hifas a las 48 h de incubación en las distintas condiciones experimentales.** AH Plus® Bioceramic Sealer (Dentsply Sirona); BioRoot™ Flow (Septodont); AH Plus® a base de resina (Dentsply); Control positivo (medio SD); Control negativo (fluconazol); DMSO (sustancia química con la cual se disolvió el fluconazol). N=4, 2 experimentos independientes en cada una de las condiciones. Test ANOVA  $p < 0,05$  y test de Tukey's.

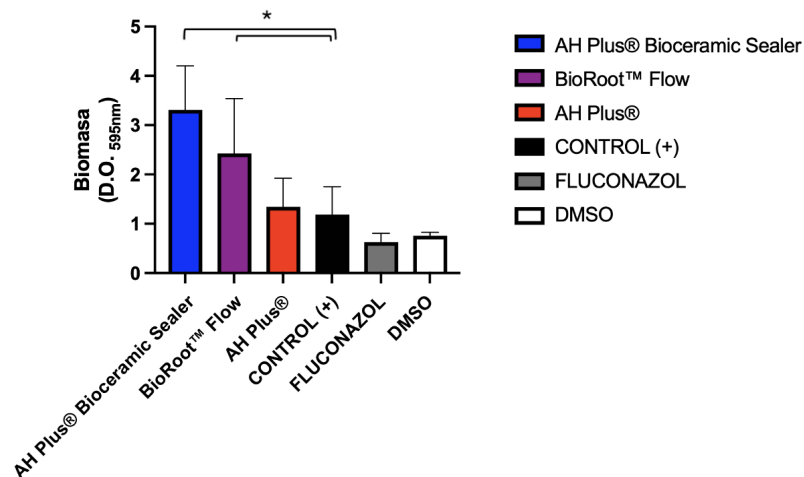
A las 96 h de formación de biopelículas se aprecia que el recuento de hifas fue mayor con el AH Plus® Bioceramic Sealer (promedio  $65 \pm 23,8$ ), seguido de DMSO (promedio  $55 \pm 5,7$ ) y el control positivo (promedio  $32,5 \pm 5,7$ ). Por otra parte, se obtuvo menor recuento de hifas con fluconazol (promedio  $7,5 \pm 5$ ), seguido de AH Plus® (promedio  $17,5 \pm 5$ ) y BioRoot™ Flow (promedio  $32,5 \pm 9,5$ ). Las condiciones que mostraron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) fueron: AH Plus® Bioceramic Sealer con Fluconazol ( $p = 0,0006$ ) y AH Plus® Bioceramic Sealer con AH Plus® a base de resina ( $p = 0,004$ ).



**Figura 6: Número de hifas a las 96 h de incubación en las distintas condiciones experimentales.** AH Plus® Bioceramic Sealer (Dentsply Sirona); BioRoot™ Flow (Septodont); AH Plus® a base de resina (Dentsply); Control positivo (medio SD); Control negativo (fluconazol); DMSO (sustancia química con la cual se disolvió el fluconazol). N=4, 2 experimentos independientes en cada una de las condiciones. Test ANOVA  $p < 0,05$  y test de Tukey's.

### 6.2.3 Evaluación indirecta del efecto de los biocerámicos en la formación/desintegración de biopelículas mediante cuantificación de biomasa.

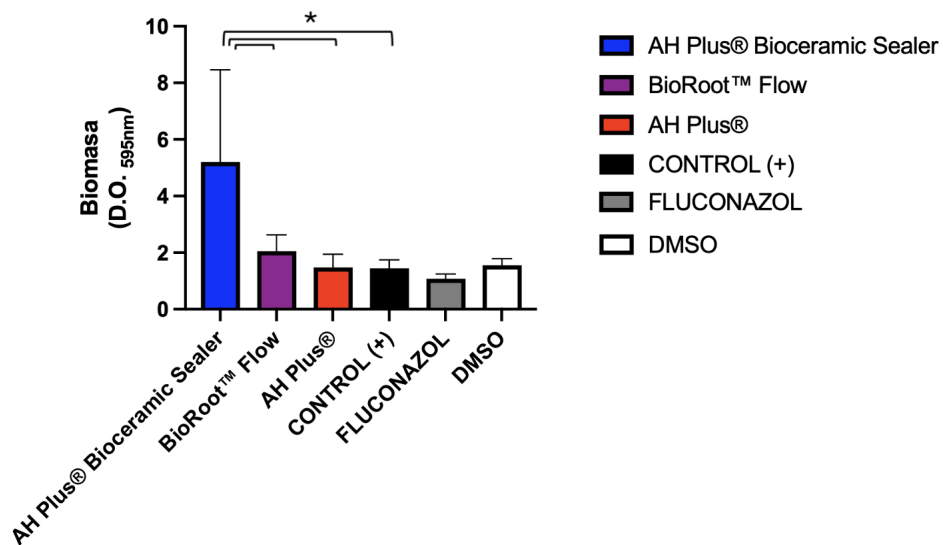
En el siguiente experimento se realizó cuantificación de la biomasa de la biopelícula a las 48 horas de incubación, con los distintos biocerámicos y los respectivos controles (**Figura 7**). Además, se cuantificó la biomasa de la biopelícula a las 96 horas de incubación. Para este último análisis, primero se permitió la formación inicial de la biopelícula hasta las 48 horas (formación de biopelícula madura), momento en el cual se agregaron los biocerámicos junto con los controles respectivos (**Figura 8**). A las 48 h de formación de biopelículas, el recuento de biomasa fue mayor con AH Plus® Bioceramic Sealer (promedio  $3,31 \pm 0,89$ ) seguido de BioRoot™ Flow (promedio  $2,42 \pm 1,1$ ) y AH Plus® a base de resina (promedio  $1,34 \pm 0,58$ ). En contraparte, el recuento de biomasa fue menor con fluconazol (promedio  $0,6 \pm 0,18$ ), seguido de DMSO (promedio  $0,75 \pm 0,06$ ) y control positivo (promedio  $1,18 \pm 0,56$ ). Todos los cementos selladores tienen diferencias estadísticas con control positivo ( $p < 0,05$ ), excepto AH Plus® con control positivo ( $p = 0,994$ ) y AH Plus® con fluconazol ( $p = 0,667$ ).



**Figura 7: Biomasa (D.O.<sub>595nm</sub>) a las 48 h de incubación en las distintas condiciones experimentales.** AH Plus® Bioceramic Sealer (Dentsply Sirona); BioRoot™ Flow (Septodont); AH Plus® a base de resina (Dentsply); Control positivo (medio SD); Control negativo (fluconazol); DMSO (sustancia química con la cual se disolvió el fluconazol). N=4, 2 experimentos independientes en cada una de las condiciones. Test ANOVA  $p < 0,05$  y test de Tukey's.



A las 96 h de formación de biopelículas, el recuento de biomasa fue mayor con el AH Plus® Bioceramic Sealer (promedio  $5,2 \pm 3,25$ ) seguido de BioRoot™ Flow (promedio  $2,05 \pm 0,56$ ) y DMSO (promedio  $1,55 \pm 0,23$ ). En contraste, el recuento de biomasa fue menor con fluconazol (promedio  $1,07 \pm 0,16$ ), seguido de control positivo (promedio  $1,44 \pm 0,3$ ) y AH Plus® a base de resina (promedio  $1,48 \pm 0,46$ ). Se observó que hubo diferencias estadísticas significativas entre AH Plus® Bioceramic Sealer con AH Plus® a base de resina ( $p=0,013$ ), AH Plus® Bioceramic Sealer con control positivo ( $p=0,012$ ) y AH Plus® Bioceramic Sealer con BioRoot™ Flow ( $p=0,04$ ).

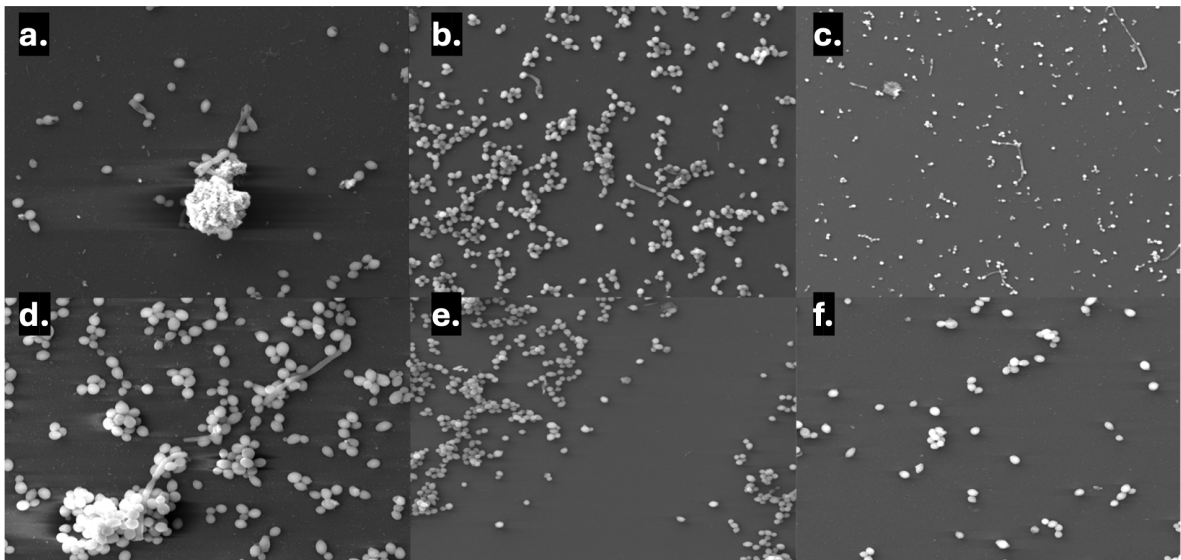


**Figura 8: Biomasa (D.O.<sub>595nm</sub>) a las 96 h de incubación en las distintas condiciones experimentales.** AH Plus® Bioceramic Sealer (Dentsply Sirona); BioRoot™ Flow (Septodont); AH plus® a base de resina (Dentsply); Control positivo (medio SD); Control negativo (fluconazol); DMSO (sustancia química con la cual se disolvió el fluconazol). N=4, 2 experimentos independientes en cada una de las condiciones. Test ANOVA  $p < 0,05$  y test de Tukey's.

## 6.2.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

### 6.2.4.1 Experimento con Biocerámicos desde el inicio (hasta 48 h):

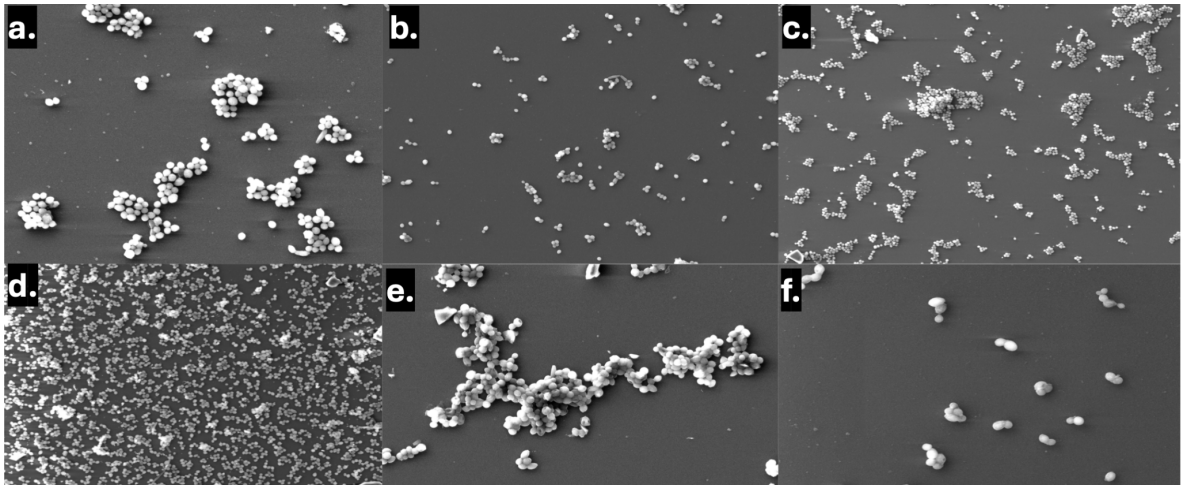
En **Figura 9a**, corresponde a la condición experimental con AH Plus® Bioceramic Sealer, se apreció un bajo número de células, además se observaron pseudohifas. La **figura 9b**, representa la condición BioRoot™ Flow en la cual se observan pseudohifas, y un mayor recuento de hifas y células respecto a la condición AH Plus® Bioceramic Sealer. La **figura 9c**, corresponde a la condición experimental AH Plus®, en el cual se observó una escasa presencia de células, hifas y pseudohifas. La **figura 9d**, corresponde al control positivo, en el cual se observó una cantidad considerable de células agregadas por todo el campo visual, además de agregados individuales y un bajo número de hifas. La **figura 9e**, corresponde a la condición experimental fluconazol y, se observaron menor cantidad de células las cuales se encontraron en pequeños agregados dispersos en el campo visual. La **figura 9f**, corresponde a DMSO se apreciaron menores cantidades de células en forma individual (desagregadas). Además, se observaron algunas microcolonias aisladas.



**Figura 9:** Microscopía electrónica de barrido (MEB) a las 48 horas de incubación; a) AH Plus® Bioceramic Sealer en cultivos de levaduras (Magnificación de 800x); b) BioRoot™ Flow en biopelículas (magnificación de 500x); c) AH Plus® a base de resina en biopelículas (magnificación de 250x); d) control positivo en biopelículas (magnificación de 1000x); e) Fluconazol en biopelículas (magnificación de 500x); f) condición experimental DMSO en biopelículas (magnificación de 750x).

#### 6.2.4.2 Experimento con Biocerámicos desde las 48 h hasta 96 h:

La **Figura 10a**, corresponde a la condición experimental AH Plus® Bioceramic Sealer, donde se observaron pequeñas microcolonias, dispersas y un bajo número de hifas. No se observó una estructura típica de biopelícula, ya que las células están desagregadas. La **figura 10b**, corresponde a la condición experimental BioRoot™ Flow, se observaron pequeñas microcolonias con células desagregadas, dispersas, un bajo número de pseudohifas y no se observaron hifas. La **figura 10c**, corresponde a AH Plus® a base de resina, en el cual se observaron microcolonias y células aisladas, no se observaron hifas. En la **figura 10d**, se puede apreciar el control positivo, en el cual se observaron una cantidad considerable de células de *Candida albicans* agregadas, formando colonias por todo el campo visual, además de células individuales y se observó un bajo número de hifas. La **figura 10e**, corresponde a la condición experimental fluconazol donde se observaron un bajo número de células y no hay presencia de hifas. Por otra parte, estas células se encontraron en pequeños agregados dispersas en el campo visual. En la **figura 10f**, que corresponde a DMSO se apreciaron un bajo número de células en forma individual desagregadas. Además, se observaron algunas microcolonias aisladas, sin presencia de hifas.



**Figura 10:** Microscopía electrónica de barrido (MEB) a las 96 horas de incubación; a) AH Plus® Bioceramic Sealer en biopelículas (magnificación de 500x); b) BioRoot™ Flow en biopelículas (magnificación de 400x); c) AH Plus® en biopelículas (magnificación de 250x); d) Control positivo en biopelículas (magnificación de 370x); e) condición experimental de fluconazol en biopelículas (magnificación de 700x); f) DMSO en biopelículas (magnificación de 1000x).

## 7. DISCUSIÓN.

La evaluación de la actividad antifúngica de los biocerámicos de uso endodóntico es un tema de creciente interés en la odontología, debido a la necesidad de mejorar la desinfección de los canales radiculares y reducir el riesgo de infecciones persistentes (Siqueira & Rôças, 2022).

*C. albicans*, uno de los principales patógenos asociados a infecciones endodónticas persistentes, es capaz de formar biopelículas resistentes a los tratamientos convencionales, lo que genera la necesidad de explorar nuevas opciones terapéuticas (Mergoni y cols., 2018). Los biocerámicos han sido propuestos como materiales potenciales para sellado de canales por sus propiedades biocompatibles y antimicrobianas, pero su efecto específico sobre levaduras aún no ha sido determinado en los diferentes tipos de biocerámicos de uso endodóntico (Sanz y cols., 2021). Este estudio busca contribuir al conocimiento sobre la actividad antifúngica de estos materiales, evaluando tanto su efecto en el crecimiento planctónico como en la formación de biopelículas de *C. albicans*, comparando su efecto con agentes antifúngicos conocidos y analizando su desempeño en condiciones *in vitro* que tratan de simular la situación clínica. Esta investigación podría orientar el desarrollo de mejores materiales endodónticos, con mayor capacidad antimicrobiana y/o antifúngica para contribuir al éxito de los tratamientos endodónticos.

Es necesario declarar que una de las limitaciones del presente trabajo de investigación son los controles positivo y negativo usados. Lo que hubiera correspondido es utilizar biocerámicos con demostrada capacidad antifúngica y no antifúngica. Hasta el desarrollo de este trabajo de investigación no existe literatura publicada con la información anteriormente mencionada, por lo que utilizamos como controles positivos y negativos lo indicado en la metodología.

### **7.1 Efecto antifúngico de los biocerámicos en la levadura mediante ensayo de difusión en agar y crecimiento planctónico.**

Al realizar la evaluación antifúngica de biocerámicos de uso endodóntico, mediante ensayo de difusión en agar, no se observó que éstos generen un halo de inhibición, no así el control negativo, fluconazol, el cual sí presentó esta característica. Esto se explica debido al mecanismo de acción que presenta el fluconazol, el cual es inhibir la enzima desmetilasa del Lanosterol de la membrana citoplasmática de hongos mediante la unión a las enzimas del citocromo P450, lo cual lleva a la acumulación del metilesterol y la reducción de la concentración del ergosterol, el cual es un esterol esencial para la integridad de la membrana citoplasmática fúngica (Tuck y cols., 1991; Lu y cols., 2021). Las otras condiciones no generaron halos de inhibición. Sin embargo, estudios previos han demostrado que los biocerámicos sí pueden generar halos de inhibición. Por ejemplo, en el estudio de Rathod y cols. (2020), se empleó un sellador biocerámico para canales radiculares como BC (Brasseler, USA) y el sellador autoadhesivo a base de resina Epiphany (RealSeal, SybronEndo, Orange, CA, USA), los cuales solo tuvieron un efecto antifúngico en ensayos de difusión en agar pero no realizaron curvas de crecimiento ni biopelículas. Además, dichos resultados no son directamente comparables con nuestro estudio, ya que los materiales utilizados no fueron los mismos (AH Plus® Bioceramic Sealer y BioRoot™ Flow).

Es importante recalcar que en una aplicación clínica los biocerámicos, fraguan en el interior de los canales radiculares. En esta condición, el mayor efecto antifúngico de los biocerámicos se produce dentro de las 24 horas y disminuye progresivamente. Durante este periodo, se genera un ambiente básico con un pH de hasta 12,4, lo que les confiere características antimicrobianas. En cambio, en condiciones *in vitro*, como este trabajo de investigación, el proceso de fraguado ocurrió en moldes de silicona en una atmósfera húmeda durante 72 h. Esto representa una limitación de nuestro trabajo, ya que utilizamos discos de biocerámicos ya fraguados, lo cual es diferente a la situación clínica.

Por otra parte, existen limitaciones propias del ensayo de difusión en agar que corresponden, por ejemplo, a la afinidad del material por el agar, por ello hay algunos materiales que difunden de mejor manera por éste generando

mayores halos de inhibición. Los biocerámicos, una vez fraguados, pueden tener dificultades para difundir adecuadamente a través del agar, lo que podría explicar la ausencia o menor tamaño de halos de inhibición observados en comparación con otros materiales. Para futuros ensayos se podría utilizar menor concentración de agar para dejar una capa más fluida con mayor tamaño de poro. Estudios recientes han demostrado que la afinidad del material por el agar y su capacidad para liberar componentes activos son factores críticos que afectan la formación de estos halos. Por ejemplo, en un estudio sobre la actividad antimicrobiana de selladores de canales radiculares, se observó que los biocerámicos muestran actividad antimicrobiana más limitada en comparación con otros materiales como el óxido de zinc-eugenol, debido en parte a su menor capacidad de difusión en agar (Kharouf y cols., 2020; Dagna y cols., 2022). Además, el método de difusión de agar no es del todo confiable, ya que éste depende de otros factores como la concentración del agar, las condiciones de almacenamiento de la placa, el tiempo de incubación, el tamaño y el número de muestras o placas, la cantidad de medio de cultivo, la incapacidad para distinguir entre bacteriostático y propiedades bactericidas, en nuestro caso fungistático y fungicida, y sólo puede probarse en estado semi-sólido (Rathod y cols., 2020).

Con respecto a las curvas de crecimiento de la levadura hasta alcanzar la fase estacionaria, y utilizando los diferentes biocerámicos, confirmamos los datos obtenidos previamente mediante pruebas de difusión en agar. Esto es, no se observaron diferencias significativas en el crecimiento de la levadura entre los biocerámicos y el control positivo. Sin embargo, el fluconazol mostró diferencias significativas a partir de las 6 horas de incubación en comparación con todas las condiciones experimentales. Hasta el momento, no se han encontrado estudios en la literatura que utilicen curvas de crecimiento para evaluar el efecto de los biocerámicos, lo que limita la posibilidad de comparar nuestros resultados con investigaciones previas. A partir de estos datos, se podría inferir que los biocerámicos no poseen un efecto antifúngico significativo o, alternativamente, que el ensayo utilizado no es completamente aplicable, ya que la capacidad antimicrobiana de estos materiales disminuye progresivamente durante su proceso de fraguado, y en este estudio se utilizaron discos de biocerámicos que ya estaban

fraguados. Por lo que en futuros estudios *in vitro* se podrían utilizar biocerámicos con distintos tiempos de fraguado.

## **7.2 Efecto antifúngico de los biocerámicos en la formación/desintegración de biopelículas de *Candida albicans*.**

Al evaluar la viabilidad de *Candida albicans*, depositando los biocerámicos y controles desde el inicio de la formación de biopelículas, se pudo observar que la levadura presentó mayor recuento viable en el control positivo con respecto a todas las otras condiciones experimentales, lo cual es acorde a lo esperado. Sin embargo, los biocerámicos AH Plus® Bioceramic Sealer y BioRoot™ Flow mostraron un efecto de reducción en el recuento viable a las 48 horas de incubación en comparación con el control positivo; no obstante, esta diferencia no fue estadísticamente significativa, sin embargo, en las imágenes obtenidas mediante SEM se aprecia un bajo número de células formando co-agregados en comparación al control (+). Lo anterior es un resultado similar al observado en el estudio realizado por Hage y cols. (2023), sin embargo, la diferencia radica en que dichos autores emplearon una cepa distinta de *Candida albicans*, específicamente ATCC 10231, y evaluaron otros biocerámicos, como Sealite, Bio-C Sealer, AH Plus, CeraSeal, TotalFill y K-Biocer.

Por otra parte, en el cemento a base de resina AH Plus® se observó menor recuento viable de todas las condiciones, con diferencias estadísticas significativas. Estos hallazgos coinciden con las imágenes obtenidas mediante MEB, donde se observaron escasos números de células, hifas y pseudohifas. Asimismo, estos resultados son consistentes con los estudios de Miyagak y cols. (2006), quienes también observaron un efecto antifúngico de AH Plus® en *Candida albicans* (cepa ICB/USP 562; proveniente de una lesión de piel), pero esta cepa no proviene de un aislado clínico oral, por tanto los resultados no son comparables. Se sugiere que el efecto antifúngico mencionado anteriormente podría estar relacionado con la liberación de bisfenol A diglicidil éter desde el cemento a base de resina, un componente que podría reducir la viabilidad celular. Sin embargo, es importante destacar que no existe suficiente evidencia científica que respalde completamente esta hipótesis (Oh y cols., 2016). Considerando los datos obtenidos,

se puede inferir preliminarmente que los biocerámicos utilizados presentan capacidad para inhibir el crecimiento y formación de biopelícula de *Candida albicans* (Figuras 9 y 10).

En el experimento de recuento de células viables, en el cual se aplicaron los biocerámicos y los controles después de 48 horas de formación de biopelículas, se observó que a las 96 horas de incubación hubo un recuento viable significativamente menor ( $p < 0,05$ ) en las condiciones con AH Plus® y BioRoot Flow en comparación con el control positivo (Figura 4). Además, estos recuentos viables fueron menores a los cuantificados en las mismas condiciones a las 48 horas de este ensayo. Esto sugiere que estos cementos endodónticos podrían tener la capacidad de desintegrar la biopelícula madura de *C. albicans*. Estos resultados se confirman con las imágenes obtenidas mediante MEB (Figuras 9 y 10), en las que se observa que, en la condición experimental BioRoot™ Flow, hay una disminución considerable de levaduras, así como ausencia de hifas. Esto es similar a lo observado en la condición experimental AH Plus®. Por otro lado, en el caso de AH Plus® Bioceramic Sealer, se observó mayor viabilidad de las levaduras a las 96 horas, en comparación a los dos anteriores cementos endodónticos, lo que indica que este cemento endodóntico no tiene o bien tiene menor capacidad para desintegrar la biopelícula de *C. albicans*.

Las hifas de la levadura, tienen un rol en la formación de biopelículas al aportar un andamiaje estructural (Wu y cols., 2020), y en esta condición le permite a la levadura ser altamente resistente a los antifúngicos y a la respuesta inmunitaria (Mayer y cols., 2013; Chow y cols., 2021; Juzbašić y cols., 2021). Respecto al recuento de hifas, las que fueron cuantificadas como una medida indirecta de formación/desintegración de biopelículas, se observó que a las 48 y 96 horas, el recuento de hifas en la condición experimental AH Plus® Bioceramic Sealer fue similar al del control positivo, lo que indicaría que no hubo un efecto inhibitorio en la formación de hifas. Sin embargo, esto no se correlacionó con las imágenes obtenidas mediante MEB, donde a las 48 horas no se detectó presencia de hifas en la condición experimental AH Plus® Bioceramic Sealer, pero sí un bajo número de células co-agregadas. A las 96 horas de incubación, a pesar del elevado número de células observadas, éstas se presentaron de forma desagregada, lo que



no es característico de una biopelícula madura, sugiriendo un posible efecto en la desintegración de biopelículas. En contraste, BioRoot™ Flow presentó menor recuento de hifas a las 48 horas en comparación con el control positivo, con diferencias estadísticas significativas, lo que sugiere su capacidad para inhibir la formación de hifas y por ende podría estar inhibiendo la formación de biopelículas. Sin embargo, a las 96 horas, todas las condiciones experimentales mostraron efecto negativo en la capacidad de la levadura para formar hifas, incluyendo el control positivo, el que también experimentó una disminución considerable en el recuento de éstas.

Esta última condición experimental podría deberse a la liberación de farnesol por parte de la levadura, el cual es una molécula de señalización que permite a la levadura sobrevivir en condiciones de estrés, como la falta de recursos. El farnesol utiliza el mecanismo de *quorum sensing*, un proceso que permite a *Candida albicans* regular su crecimiento y transición morfológica en respuesta a la densidad celular. Cuando la densidad celular es alta, el farnesol se acumula y evita la formación de hifas, lo cual puede ser beneficioso para la población al prevenir la sobrepoblación y el agotamiento de recursos (Min y cols., 2021). De los tres cementos selladores evaluados, AH Plus® fue el que generó menor recuento de hifas, lo que sugiere que tendría un mayor efecto en la inhibición de la formación de biopelículas. Esto se confirma con las imágenes obtenidas mediante MEB, donde, a las 48 horas, se observó un bajo número de hifas, y a las 96 horas, no se apreció hifas en comparación con las otras condiciones experimentales.

En este estudio también se cuantificó la biomasa generada por las biopelículas de *C. albicans*. Esta variable también permite, de manera indirecta, evaluar la eficacia antimicrobiana de los cementos de uso endodóntico utilizados. Los resultados obtenidos a las 48 horas muestran mayor biomasa en los cementos endodónticos escribir bien esto respecto a los controles, siendo AH Plus® Bioceramic Sealer la condición experimental que produjo significativamente mayor biomasa de la biopelícula, lo que sugiere que estos cementos endodónticos no impiden la formación de éstas. En cambio, a las 96 horas de formación de biopelículas, AH Plus® Bioceramic Sealer fue la condición experimental que provocó significativamente mayor biomasa de la biopelícula, sugiriendo que no

presenta efecto inhibidor sobre la biopelícula ya formada o madura. Por otro lado, los demás cementos endodónticos no mostraron diferencias estadísticas significativas en comparación con las condiciones experimentales fluconazol o control positivo, lo que implica que no se puede asumir un efecto antifúngico significativo.

A pesar de la utilidad del método de cristal violeta para cuantificar la biomasa de biopelículas, éste presenta ciertas limitaciones. Por ejemplo, la sensibilidad del método puede verse afectada por diversas variables experimentales, tales como, el tiempo de incubación, las condiciones de cultivo y la técnica de lavado, lo que puede dar resultados no reproducibles. Además, el método de cristal violeta no permite diferenciar entre células vivas y muertas dentro de la biopelícula, lo que podría ser problemático al evaluar la eficacia antimicrobiana, como es el caso en este estudio, ya que un aumento en la biomasa no necesariamente indica un incremento en el número de células viables. Por último, la especificidad del método es limitada, ya que no sólo tiñe la biomasa, sino también puede teñir residuos de proteínas y otros materiales no celulares, lo que podría llevar a una sobreestimación de la cantidad de biopelícula presente (Peeters y cols., 2008).

Los resultados de este estudio han brindado una perspectiva diversa sobre el efecto antifúngico de los biocerámicos AH Plus® Bioceramic Sealer y BioRoot™ Flow en *Candida albicans*. Sin embargo, nuestro trabajo de investigación presenta resultados preliminares que tienen la potencialidad de ser escalados a una situación *in situ* o *ex vivo*, para probar el efecto antifúngico de biocerámicos endodónticos. No obstante, el estudio de Sokolonski y cols. (2023) sí reportó un efecto antifúngico utilizando dos biocerámicos diferentes: MTA (Angelus, Londrina, Brasil) y BioRoot RCS (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, Francia). Es importante señalar que el ensayo de difusión en agar de ese estudio difería del nuestro, ya que los investigadores realizaron un pozo en el centro del agar donde colocaron los biocerámicos mezclados. Posteriormente, las placas fueron incubadas, permitiendo que los cementos endodónticos fraguaran. Este procedimiento podría haber facilitado una mejor difusión del biocerámico en el medio, lo que explica los resultados positivos observados en dicho estudio.

La proyección de esta investigación es profundizar nuestro conocimiento sobre el comportamiento de *Candida albicans* frente a los distintos biomateriales de uso endodóntico disponibles en el mercado. Para ello, es necesario mejorar tanto la técnica como el modelo de estudio, con el objetivo de replicar de mejor manera las condiciones del medio oral y del sistema de canales radiculares. Es crucial continuar investigando el uso de biocerámicos y sus capacidades antimicrobianas en biopelículas de una sola especie y en biopelículas de múltiples especies (Wang y cols., 2021).

Para crear un entorno más cercano a la condición clínica, se podrían emplear bloques de dentina, esmalte o incluso dientes extraídos. Además, es esencial evaluar *in vitro* la efectividad de todo el protocolo endodóntico utilizado en odontología, incluyendo la preparación químico-mecánica. Como se ha observado en este estudio y en investigaciones previas, como la de Hage y cols. (2023), los biocerámicos proporcionan una capa adicional de defensa contra la colonización bacteriana. Sin embargo, los cementos endodónticos en general presentan una actividad antimicrobiana limitada, lo que hace improbable que, por sí solos, eliminen todos los microorganismos remanentes con potencial patogénico (Hage y cols., 2023). Por esta razón, no se debe confiar únicamente en ellos como el medio principal o coadyuvante para la desinfección del SCR. Un desbridamiento mecánico eficaz, acompañado de la irrigación con soluciones antimicrobianas y la aplicación de métodos de activación como el ultrasonido o el láser, es fundamental para alcanzar una desinfección óptima. Los selladores biocerámicos pueden desempeñar un papel complementario en estos procedimientos, incrementando la efectividad global del tratamiento endodóntico y disminuyendo la probabilidad de infecciones persistentes (Seron y cols., 2024).

Además, se propone a la industria odontológica-endodóntica evaluar la incorporación de nuevos biomateriales en los biocerámicos para mejorar sus propiedades antimicrobianas y mecánicas. Esto incluye la adición de iones (como plata y cobre), el uso de nanopartículas, o la incorporación de partículas co-ensambladas de sílice con antimicrobianos o antifúngicos. Estos componentes han demostrado una gran actividad antimicrobiana y también podrían mejorar la solubilidad de los biocerámicos en el tiempo (Dong y cols., 2023).

## 8. CONCLUSIONES

En este estudio, se evaluó la capacidad antifúngica de dos biocerámicos endodónticos; AH Plus® Bioceramic Sealer y BioRoot™ Flow. Los resultados indican que estos materiales no tienen efecto antifúngico significativo en su forma planctónica, según los ensayos de difusión en agar y las curvas de crecimiento. Sin embargo, los biocerámicos sí lograron reducir significativamente la viabilidad de *Candida albicans* durante la formación de biopelículas.

Entre los materiales estudiados, el sellador endodóntico AH Plus® a base de resina mostró mayor efecto antifúngico contra *C. albicans*. Por otro lado, entre los biocerámicos, BioRoot™ Flow demostró mayor efecto antifúngico, mientras que AH Plus® Bioceramic Sealer mostró menor efecto antifúngico.

## PROYECCIONES

A pesar de los resultados preliminares, es necesario realizar estudios adicionales a largo plazo, de mayor escala y en condiciones clínicas reales para determinar con mayor precisión la efectividad de los selladores endodónticos a base de biocerámicos. Estos estudios deben considerar, no solo la actividad antifúngica de los materiales, sino también la durabilidad de esta actividad a lo largo del tiempo, especialmente en el entorno dinámico de la cavidad oral. Una evaluación integral de estos factores permitirá fundamentar mejor la decisión de utilizar selladores biocerámicos en lugar de otros selladores endodónticos, optimizando así los resultados clínicos en el tratamiento de canales radiculares.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abusrewil, S. M., McLean, W., & Scott, J. A. (2018). The use of Bioceramics as root-end filling materials in periradicular surgery: A literature review. *Saudi Dental Journal*, 30(4), 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2018.07.004>
- Alberti, A., Corbella, S., Taschieri, S., Francetti, L., Fakhruddin, K. S., & Samaranayake, L. P. (2021). Fungal species in endodontic infections: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 16(7), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255003>
- Alshanta, O. A., Shaban, S., Nile, C. J., McLean, W., & Ramage, G. (2019). *Candida albicans* biofilm heterogeneity and tolerance of clinical isolates: Implications for secondary endodontic infections. *Antibiotics*, 8(4), 1–13. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040204>
- Belibasakis, G. N. (2018). Microbiological changes of the ageing oral cavity. *Archives of Oral Biology*, 96(August), 230–232. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.10.001>
- Bjørndal, L. (2008). The Caries Process and Its Effect on the Pulp: The Science Is Changing and So Is Our Understanding. *Journal of Endodontics*, 34(7 SUPPL.). <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.02.037>
- Bordagaray, M. J., Fernández, A., Garrido, M., Astorga, J., Hoare, A., & Hernández, M. (2021). Systemic and Extraradicular Bacterial Translocation in Apical Periodontitis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(March), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.649925>
- Bramante, C. M., Oropeza, R. M. O., de Assis, G. F., Garcia, R. B., Duarte, M. A. H., Bramante, A. S., Bernardineli, N., & de Moraes, I. G. (2012). Biocompatibility and setting time of gray Portland cement clinker with or without calcium sulfate. *Dental Press Endodontics*, 2(3), 21–26.

- Cannon, R. D., Nand, A. K., & Jenkinson, H. F. (1995). Adherence of *Candida albicans* to human salivary components adsorbed to hydroxylapatite. *Microbiology*, 141(1), 213–219. <https://doi.org/10.1099/00221287-141-1-213>
- Chow, E. W. L., Pang, L. M., & Wang, Y. (2021). From Jekyll to Hyde: The Yeast–Hyphal Transition of *Candida albicans*. *Pathogens*, 10(7), 859. <https://doi.org/10.3390/pathogens10070859>
- Dagna, A., Colombo, M., Poggio, C., Russo, G., Pellegrini, M., & Beltrami, R. (2022). In Vitro Antibacterial Activity of Different Bioceramic Root Canal Sealers. *Ceramics*, 5(4), 901-907. <https://doi.org/10.3390/ceramics5040065>
- Debelian, G., & Trope, M. (2016). The use of premixed bioceramic materials in endodontics. *Giornale Italiano Di Endodonzia*, 30(2), 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.gien.2016.09.001>
- do Rosário Palma, A. L., Domingues, N., de Barros, P. P., Brito, G. N. B., & Jorge, A. O. C. (2019). Influence of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus sanguinis* on virulence of *Candida albicans*: in vitro and in vivo studies. *Folia microbiologica*, 64(2), 215–222. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0645-9>
- Dong, X., & Xu, X. (2023). Bioceramics in Endodontics: Updates and Future Perspectives. *Bioengineering* (Basel, Switzerland), 10(3), 354. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10030354>
- Egan, M. W., Spratt, D. A., Ng, Y. L., Lam, J. M., Moles, D. R., & Gulabivala, K. (2002). Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. *International Endodontic Journal*, 35(4), 321–329. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2002.00478.x>
- Espinoza, F., Lizana, A., & Muñoz, P. (2020). Biocerámicos en odontología, una revisión de literatura. *Canal abierto*, 41, 14-21.
- Estrela, C., Decurcio, D. A., Rossi-Fedele, G., Silva, J. A., Guedes, O. A., & Borges, Á. H. (2018). Root perforations: a review of diagnosis, prognosis and materials. *Brazilian Oral Research*, 32(suppl 1), e73. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0073>
- Ev, L. D., Damé-Teixeira, N., DO, T., Maltz, M., & Parolo, C. C. F. (2020). The role of *Candida albicans* in root caries biofilms: an RNA-seq analysis. *Journal*

of applied oral science: *Revista FOB*, 28, e20190578.  
<https://doi.org/10.1590/1678-7757-2019-0578>

- Gandolfi, M. G., Taddei, P., Modena, E., Siboni, F., & Prati, C. (2013). Biointeractivity-related versus chemi/physisorption-related apatite precursor-forming ability of current root end filling materials. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 101(7), 1107–1123. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32920>
- Gest, H. (2004). The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society. *Notes and Records of the Royal Society*, 58(2), 187–201. <https://doi.org/10.1098/rsnr.2004.0055>
- Güven, E. P., Taşlı, P. N., Yalvac, M. E., Sofiev, N., Kayahan, M. B., & Sahin, F. (2013). In vitro comparison of induction capacity and biomineralization ability of mineral trioxide aggregate and a bioceramic root canal sealer. *International Endodontic Journal*, 46(12), 1173–1182. <https://doi.org/10.1111/iej.12115>
- Haapasalo, M., Udnaes, T., & Endal, U. (2003). Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post-treatment. *Endodontic Topics*, 6(1), 29–56. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2003.00041.x>
- Hage, W., Sarkis, D. K., Kallasy, M., Sfeir, G., Mallah, M., Hachem, R. E., Khalil, I., & Zogheib, C. (2023). Antimicrobial Activity of Five Calcium Silicate Based Root Canal Sealers against a Multispecies Engineered Biofilm: An In Vitro Study. *The journal of contemporary dental practice*, 24(9), 707–714. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-3556>
- Hagihara, Y., Kaminishi, H., Cho, T., Tanaka, M., & Kaita, H. (1988). Degradation of human dentine collagen by an enzyme produced by the yeast *Candida albicans*. *Archives of Oral Biology*, 33(8), 617–619. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(88\)90138-0](https://doi.org/10.1016/0003-9969(88)90138-0)
- Han, L., Kodama, S., & Okiji, T. (2015). Evaluation of calcium-releasing and apatite-forming abilities of fast-setting calcium silicate-based endodontic materials. *International Endodontic Journal*, 48(2), 124–130. <https://doi.org/10.1111/iej.12290>

- Huang, X., Lin, J., Parhar, M., Shen, Y., Haapasalo, M., & Wei, X. (2015). Clinical use of bioceramic materials. *Endodontic Topics*, 32(1), 97–117. <https://doi.org/10.1111/etp.12078>
- Jerez-Olate, C., Araya, N., Alcántara, R., Luengo, L., Bello-Toledo, H., González-Rocha, G., & Sánchez-Sanhueza, G. (2022). In vitro antibacterial activity of endodontic bioceramic materials against dual and multispecies aerobic-anaerobic biofilm models. *Australian Endodontic Journal*, 48(3), 465–472. <https://doi.org/10.1111/aej.12587>
- Juzbašić, M., Matijević, T., Pustijanac, E., Bekić, S., Kotris, I., & Škrlec, I. (2021). *Candida albicans*—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *Journal of Fungi*, 7(2), 79. <https://doi.org/10.3390/jof7020079>
- Kharouf, N., Arntz, Y., Eid, A., Zghal, J., Sauro, S., Haikel, Y., & Mancino, D. (2020). Physicochemical and antibacterial properties of novel, premixed calcium silicate-based sealer compared to powder-liquid bioceramic sealer. *Journal of Clinical Medicine*, 9(10), 3096. <https://doi.org/10.3390/jcm9103096>
- Kinirons M. J. (1983). Candidal invasion of dentine complicating hypodontia. *British Dental Journal*, 154(12), 400–401. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4805102>
- Klotz, S. A., Rutten, M. J., Smith, R. L., Babcock, S. R., & Cunningham, M. D. (1993). Adherence of *candida albicans* to immobilized extracellular matrix proteins is mediated by calcium-dependent surface glycoproteins. In *Microbial Pathogenesis* (Vol. 14, Issue 2, pp. 133–147). <https://doi.org/10.1006/mpat.1993.1014>
- Liljemark, W. F., & Bloomquist, C. (1996). Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 7(2), 180–198. <https://doi.org/10.1177/10454411960070020601>
- López-García, S., Myong-Hyun, B., Lozano, A., García-Bernal, D., Forner, L., Llena, C., Guerrero-Gironés, J., Murcia, L., & Rodríguez-Lozano, F. J. (2020). Cytocompatibility, bioactivity potential, and ion release of three premixed calcium silicate-based sealers. *Clinical Oral Investigations*, 24(5), 1749–1759. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-03036-2>



- Lozano Moraga, C. P., Rodríguez Martínez, G. A., Lefimil Puente, C. A., Morales Bozo, I. C., & Urzúa Orellana, B. R. (2017). Prevalence of *Candida albicans* and carriage of *Candida* non-*albicans* in the saliva of preschool children, according to their caries status. *Acta Odontologica Scandinavica*, 75(1), 30–35. <https://doi.org/10.1080/00016357.2016.1244560>
- Lu, H., Shrivastava, M., Whiteway, M., & Jiang, Y. (2021). *Candida albicans* targets that potentially synergize with fluconazole. *Critical Reviews in Microbiology*, 47(3), 323–337. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1884641>
- Marsh, P. D., & Percival, R. S. (2006). The oral microflora - Friend or foe? Can we decide? *International Dental Journal*, 56(4 SUPPL. 1), 233–239. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595x.2006.tb00107.x>
- Marsh, P. D., & Zaura, E. (2017). Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *Journal of clinical periodontology*, 44 (Suppl 18), S12–S22. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12679>
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119-128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>
- McCullough, M. J., Ross, B. C., & Reade, P. C. (1996). *Candida albicans*: A review of its history, taxonomy, epidemiology virulence attributes, and methods of strain differentiation. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 25(2), 136–144. [https://doi.org/10.1016/S0901-5027\(96\)80060-9](https://doi.org/10.1016/S0901-5027(96)80060-9)
- Mergoni, G., Percudani, D., Lodi, G., Bertani, P., & Manfredi, M. (2018). Prevalence of *Candida* Species in Endodontic Infections: Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Endodontics*, 44(11), 1616-1625.e9. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.07.016>
- Min, K., Jannace, T. F., Si, H., Veeramah, K. R., Haley, J. D., & Konopka, J. B. (2021). Integrative multi-omics profiling reveals cAMP-independent mechanisms regulating hyphal morphogenesis in *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*, 17(8), e1009861. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009861>
- Miyagak, D. C., de Carvalho, E. M., Robazza, C. R., Chavasco, J. K., & Levorato, G. L. (2006). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of

- endodontic sealers. *Brazilian Oral Research*, 20(4), 303–306.  
<https://doi.org/10.1590/s1806-83242006000400004>
- Mohammadi, Z., & Asgary, S. (2015). A comparative study of antifungal activity of endodontic irrigants. *Iranian Endodontic Journal*, 10(2), 144–147.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25834602%0A>
  - Nikawa, H., Egusa, H., Yamashiro, H., Nishimura, M., Makihira, S., Jin, C., Fukushima, H., & Hamada, T. (2006). The effect of saliva or serum on bacterial and *Candida albicans* colonization on type I collagen. *Journal of Oral Rehabilitation*, 33(10), 767–774. <https://doi.org/10.1046/j.0305-182X.2003.01149.x>
  - Nikawa, H., Yamashiro, H., Makihira, S., Nishimura, M., Egusa, H., Furukawa, M., Setijanto, D., & Hamada, T. (2003). In vitro cariogenic potential of *Candida albicans*. *Mycoses*, 46(11-12), 471–478. <https://doi.org/10.1046/j.0933-7407.2003.00888.x>
  - Oh, S., Perinpanayagam, H., Kum, D. J. W., Lim, S. M., Yoo, Y. J., Chang, S. W., Lee, W., Baek, S. H., Zhu, Q., & Kum, K. Y. (2016). Evaluation of three obturation techniques in the apical third of mandibular first molar mesial root canals using micro-computed tomography. *Journal of Dental Sciences*, 11(1), 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2015.11.002>
  - Patel M. (2022). Oral Cavity and *Candida albicans*: Colonisation to the Development of Infection. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 11(3), 335. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030335>
  - Peeters, E., Nelis, H. J., & Coenye, T. (2008). Comparison of Multiple Methods for Quantification of Microbial Biofilms Grown in Microtiter Plates. *Journal of Microbiological Methods*, 72(2), 157-165. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.11.010>
  - Persoon, I. F., Crielaard, W., & Özok, A. R. (2017). Prevalence and nature of fungi in root canal infections: a systematic review and meta-analysis. *International Endodontic Journal*, 50(11), 1055–1066. <https://doi.org/10.1111/iej.12730>

- Preparation, F., & Camilleri, J. (2014). Mineral Trioxide Aggregate in Dentistry. In *Mineral Trioxide Aggregate in Dentistry*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-55157-4>
- Rathod, R. K., Taide, P. D., & Dudhale, R. D. (2020). Assessment of Antimicrobial Efficacy of Bioceramic Sealer, Epiphany Self-etch Sealer, and AH-Plus Sealer against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*: An *In vitro* Study. *Nigerian journal of surgery: official publication of the Nigerian Surgical Research Society*, 26(2), 104–109. [https://doi.org/10.4103/njs.NJS\\_60\\_19](https://doi.org/10.4103/njs.NJS_60_19)
- Rojas, A., Medina, B., Dufeu, A., Pino, A., Ghisellini, A., & Pedreros, L. (2012). Comparación de la Calidad de Obturación Radicular, entre el Sistema Termoplastificado Calamus y el Sistema de Compactación Lateral en Frío Comparison of the Quality of Root Obturation between the Calamus Thermo Plasticized System and the Cold Lateral Comp. *International Journal of Odontostomatology*, 6(2), 115–121. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-381X2012000200001>
- Rosier, B. T., Marsh, P. D., & Mira, A. (2018). Resilience of the Oral Microbiota in Health: Mechanisms That Prevent Dysbiosis. *Journal of Dental Research*, 97(4), 371–380. <https://doi.org/10.1177/0022034517742139>
- Sanz, J. L., Guerrero-Gironés, J., Pecci-Lloret, M. P., Pecci-Lloret, M. R., & Melo, M. (2021). Biological interactions between calcium silicate-based endodontic biomaterials and periodontal ligament stem cells: A systematic review of *in vitro* studies. *International Endodontic Journal*, 54(11), 2025–2043. <https://doi.org/10.1111/iej.13600>
- Sakko, M., Tjäderhane, L., & Rautemaa-Richardson, R. (2016). Microbiology of Root Canal Infections. *Primary Dental Journal*, 5(2), 84–89. <https://doi.org/10.1308/205016816819304231>
- Seron, M. A., Nunes, G. P., Ferrisse, T. M., Strazzi-Sahyon, H. B., Dos Santos, P. H., Gomes-Filho, J. E., Cintra, L. T. A., & Sivieri-Araujo, G. (2024). Influence of bioceramic sealers on dentinal tubule penetration and antimicrobial effectiveness: a systematic review and meta-analysis of *in vitro*

- studies. *Odontology*, 112(3), 672–699. <https://doi.org/10.1007/s10266-024-00904-6>
- Shaik, J. A., & Reddy, R. K. (2017). Review Article Prevention and Treatment of White Spot Lesions in Orthodontic Patients. *Contemporary Clinical Dentistry*, 8(September), 11–19. <https://doi.org/10.4103/ccd.ccd>
  - Silva Almeida, L. H., Moraes, R. R., Morgental, R. D., & Pappen, F. G. (2017). Are Premixed Calcium Silicate–based Endodontic Sealers Comparable to Conventional Materials? A Systematic Review of In Vitro Studies. *Journal of Endodontics*, 43(4), 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.11.019>
  - Siqueira, J. F. (2002). Endodontic infections: Concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 94(3), 281–293. <https://doi.org/10.1067/moe.2002.126163>
  - Siqueira, J. F., Jr, & Rôças, I. N. (2022). Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. *International Endodontic Journal*, 55 Suppl 3, 512–530. <https://doi.org/10.1111/iej.13677>
  - Siqueira, J. F., & Sen, B. H. (2004). Fungi in endodontic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 97(5), 632–641. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2003.12.022>
  - Sokolonski, A. R., Amorim, C. F., Almeida, S. R., Lacerda, L. E., Araújo, D. B., Meyer, R., & Portela, R. D. (2023). Comparative antimicrobial activity of four different endodontic sealers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(3), 1717–1721. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01003-4>
  - Sundqvist, G., & Figdor, D. (2003). Life as an endodontic pathogen. Ecological differences between the untreated and root-filled root canals. *Endodontic Topics*, 6(1), 3–28. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2003.00054.x>
  - Suwartini, T., Santoso, J., Widyarman, A. S., & Ratnasari, D. (2022). Efficacy of Bioceramic and Calcium Hydroxide-Based Root Canal Sealers against Pathogenic Endodontic Biofilms: An In vitro Study. *Contemporary Clinical Dentistry*, 13(4), 322–330. [https://doi.org/10.4103/ccd.ccd\\_198\\_21](https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_198_21)
  - Tuck, S. F., Patel, H., Safi, E., & Robinson, C. H. (1991). Lanosterol 14 alpha-demethylase (P45014DM): effects of P45014DM inhibitors on sterol

biosynthesis downstream of lanosterol. *Journal of Lipid Research*, 32(6), 893–902.

- Turk, B. T., Ates, M., & Sen, B. H. (2008). The effect of treatment of radicular dentin on colonization patterns of *C. albicans*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 106(3), 457–462. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2008.05.012>
- Wang, Z., Shen, Y., & Haapasalo, M. (2021). Antimicrobial and Antibiofilm Properties of Bioceramic Materials in Endodontics. *Materials* (Basel, Switzerland), 14(24), 7594. <https://doi.org/10.3390/ma14247594>
- Weiss, E. I., Shalhav, M., & Fuss, Z. (1996). Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. *Endodontics & Dental Traumatology*, 12(4), 179–184. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1996.tb00511.x>
- Wu, X., Zhang, S., Li, H., Shen, L., Dong, C., Sun, Y., Chen, H., Xu, B., Zhuang, W., Deighton, M., & Qu, Y. (2020). Biofilm Formation of *Candida albicans* Facilitates Fungal Infiltration and Persister Cell Formation in Vaginal Candidiasis. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1117. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01117>

## 10. ANEXOS.



## CERTIFICADO

El Director de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile certifica la línea de investigación titulada: “Microbiología Molecular de Caries Dentales”. Como investigadora responsable de la línea se reconoce a la Dra. **CARLA LOZANO MORAGA**, académica del Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas (ICOD) de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Dentro de las Áreas de Investigación Estratégicas, la línea de investigación pertenece a la disciplina de “Biología y Microbiología Oral” y se encuentra adscrita al área estratégica N°1 denominada “Biología y Patología Bucal y Cráneo facial” y al Área N°3 denominada Investigación Clínica y Educativa en Odontología.

Según los antecedentes evaluados, la línea se certifica por un período de 5 años.

Fecha de inicio: 1 de marzo de 2023

Fecha de término: 1 de marzo de 2028

Se extiende el presente certificado, para los fines que la interesada estime conveniente.

Santiago, 1 de marzo de 2023.



**DR. MAURICIO F. BUDINI**  
**Director de Investigación**  
**Facultad de Odontología**  
**Universidad de Chile**