Facultad De Ciencias De La Salud

Posgrado de Endodoncia

Capacidad antibacteriana de los cementos hidráulicos biocerámicos BioRoot, Bio-C Sealer, frente a la cepa de E*nterococcus faecalis* ATCC 29212, un estudio *invitro*

Tesis para la obtención del Título de Especialista en Endodoncia

Presentada por:

Karen Lizeth Razo Caicedo

Tutor:

Ing. Boris Villacrés

Quito, enero 2025

Resumen

Objetivo: investigar la capacidad antimicrobiana de los cementos hidráulicos, BioRoot y Bio-C Sealer frente al *Enterococcus faecalis* mediante experimentación *invitro.* Materiales y Métodos: se estudiaron 2 grupos, Grupo I Bio-C Sealer (ángelus) y Grupo II BioRoot (Septodont) y como control se utilizó ampicilina (total: 48 muestras). La sensibilidad de los cementos se analizó usando la técnica de siembra masiva por pocillo. Para esto, se esparció uniformemente una suspensión bacteriana sobre placas de Petri con agar Muller Hinton, utilizando. Luego, se perforaron cuatro orificios de 4 mm de diámetro y se completaron con cada cemento. Posteriormente, las muestras se incubaron a 37 °C; tras la incubación, se determinaron las zonas de inhibición de cada pocillo tres veces a las 24 h, 48 h y 72 h. Resultados: el Bio-C Sealer presentó un halo de inhibición significativamente mayor ($p < 0,05$) que el BioRoot, con una diferencia media de 1,89 mm. De manera similar, a las 48 horas se observó una diferencia media de 0,97 mm ($p < 0,05$) y a las 72 horas, el Bio-C Sealer mantuvo un halo de inhibición mayor, con una diferencia media de 1,36 mm ($p < 0,05$). Conclusión: El Bio-C Sealer es más efectivo que el BioRoot en términos de halo de inhibición en todos los intervalos de tiempo analizados.

Palabras clave: selladores biocerámicos, E. *faecalis*, halos de inhibición, silicato de calcio, efecto antimicrobiano, fallos endodónticos.

Declaración De Aceptación De Norma Ética Y Derechos

El presente documento se ciñe a las normas éticas y reglamentarias de la Universidad Hemisferios. Así, declaro que lo contenido en este ha sido redactado con entera sujeción al respeto de los derechos de autor, citando adecuadamente las fuentes. Por tal motivo, autorizo a la Biblioteca a que haga pública su disponibilidad para lectura dentro de la institución, a la vez que autorizo el uso comercial de mi obra a la Universidad Hemisferios, siempre y cuando se me reconozca el cuarenta por ciento (40%) de los beneficios económicos resultantes de esta explotación.

Además, me comprometo a hacer constar, por todos los medios de publicación, difusión y distribución, que mi obra fue producida en el ámbito académico de la Universidad Hemisferios.

De comprobarse que no cumplí con las estipulaciones éticas, incurriendo en caso de plagio, me someto a las determinaciones que la propia Universidad plantee.

Karen Lizeth Razo Caicedo

C.I. 1500612658

Dedicatoria

A mis padres, Ipatia y Efrén, por su amor y apoyo constante lo cual es una inspiración para apremiar mis sueños y nunca desmayar. Este trabajo es con mucho cariño para ustedes.

Índice de Contenidos

Índice de Contenidos 5

Indice de Figuras 6

Índice de Tablas 6

Resumen 8

Abstract 9

Introducción 10

Metodología 11

Resultados 13

Figura 1 15

Discusión 15

Conclusiones 17

Referencias 18

Indice de Figuras

Figura 1 Zona de inhibición bacteriana en diferentes intervalos de tiempo (Grupo I-II) 17

Índice de Tablas

Tabla 1. Tabla de caracterizacion bioquimica de Enterecoccus faecalis ATTCC 29212 .14

Tabla 2. Tabla estadistica de Shapiro -Wilk de Bio-C Sealer (grupo I) a las 24,48horas y adicional de Anderson Darlyn a las 72 horas 14

Tabla 3. Tabla estadistica de Shapiro – Wilk de BioRoot (grupo II) a las 24,48 y 72 horas 14

Capacidad antibacteriana de los cementos hidráulicos biocerámicos BioRoot, Bio-C Sealer, frente a la cepa de E*nterococcus faecalis* ATCC 29212, un estudio *invitro*

Karen Lizeth Razo Caicedo Correo electrónico: krazo63@yahoo.com

Resumen

Objetivo: investigar la capacidad antimicrobiana de los cementos hidráulicos, BioRoot y Bio-C Sealer frente al *Enterococcus faecalis* mediante experimentación *invitro*. Materiales y Métodos: se estudiaron 2 grupos, Grupo I Bio-C Sealer (ángelus) y Grupo II BioRoot (Septodont) y como control se utilizó ampicilina (total: 48 muestras). La sensibilidad de los cementos se analizó usando la técnica de siembra masiva por pocillo. Para esto, se esparció uniformemente una suspensión bacteriana sobre placas de Petri con agar Muller Hinton, utilizando. Luego, se perforaron cuatro orificios de 4 mm de diámetro y se completaron con cada cemento. Posteriormente, las muestras se incubaron a 37 °C; tras la incubación, se determinaron las zonas de inhibición de cada pocillo tres veces a las 24 h, 48 h y 72 h. Resultados: el Bio-C Sealer presentó un halo de inhibición significativamente mayor ($p < 0,05$) que el BioRoot, con una diferencia media de 1,89 mm. De manera similar, a las 48 horas se observó una diferencia media de 0,97 mm ($p < 0,05$) y a las 72 horas, el Bio-C Sealer mantuvo un halo de inhibición mayor, con una diferencia media de 1,36 mm ($p < 0,05$). Conclusión: El Bio-C Sealer es más efectivo que el BioRoot en términos de halo de inhibición en todos los intervalos de tiempo analizados.

Palabras clave: selladores biocerámicos, E. *faecalis*, halos de inhibición, silicato de calcio, efecto antimicrobiano, fallos endodónticos.

Abstract

Objective: To investigate the antimicrobial capacity of hydraulic cements, BioRoot and Bio-C Sealer against Enterococcus faecalis by in vitro experimentation. Materials and Methods: Two groups were studied, Group I Bio-C Sealer (Angelus) and Group II BioRoot (Septodont) and ampicillin was used as a control (total: 48 samples). The sensitivity of the cements was analyzed using the mass seeding technique per well. For this, a bacterial suspension was uniformly spread on Petri dishes with Muller Hinton agar, using. Then, four holes of 4 mm in diameter were drilled and completed with each cement. Subsequently, the samples were incubated at 37 °C; after incubation, the inhibition zones of each well were determined three times at 24 h, 48 h and 72 h. Results: Bio-C Sealer had a significantly larger inhibition zone ($p < 0.05$) than BioRoot, with a mean difference of 1.89 mm. Similarly, at 48 hours a mean difference of 0.97 mm ($p < 0.05$) was observed and at 72 hours, Bio-C Sealer maintained a larger inhibition zone, with a mean difference of 1.36 mm ($p < 0.05$). Conclusion: Bio-C Sealer is more effective than BioRoot in terms of inhibition zone at all time intervals analyzed.

Keywords: bioceramic sealants, E. faecalis, inhibition zones, calcium silicate, antimicrobial effect, endodontic failures.

Introducción

En la actualidad la endodoncia se ha convertido en una alternativa importante dentro de los tratamientos odontológicos, debido a que permite la conservación de órganos dentales en la cavidad oral afectados por causa de traumas o infecciones bacterianas (Armenta-Molina et al., 2022). El tratamiento endodóntico consiste en la remoción de bacterias de los conductos radiculares, por medio de la desinfección química, mecánica y el sellado de los conductos radiculares con el fin de evitar su re-contaminación (Kirthigaet al., 2024).

Investigaciones han evidenciado la persistencia y resistencia de diferentes tipos de especies bacterianas, tanto Gram negativas como positivas. En lo que respecta a lesiones periapicales, el *Enterococcus faecalis* es microorganismo más inmune a medicación intraconducto y protocolos biomecánicos, debido a su habilidad de adherirse al colágeno de las paredes de la dentina radicular y resistir a estos procedimientos (Zhang et al., 2015).

El *E. faecalis*, es un anaerobio facultativo, Gram positivo, que pertenece al grupo de las bacterias cocáceas, prevalece dentro de los fracasos endodónticos hasta un 90% de los casos. Este microorganismo puede ser visto como un invasor secundario que logra colonizar exitosamente el conducto perirradicular (Diaz M, 2010). Por lo tanto, en casos de fallos se formaría una infección secundaria que luego se vuelve persistente.

En el proceso de obturación radicular se emplean distintos materiales, cuyas propiedades contribuyen al éxito del tratamiento (Kirthiga et al., 2024). Entre los materiales utilizados en esta etapa, se encuentran la gutapercha y los selladores, elegidos según las necesidades específicas del paciente y las decisiones del profesional (Hauman & Love, 2003)). El sellador debe obturar el conducto principal, los conductos laterales y accesorios, así como la zona apical, adaptándose adecuadamente a la dentina para lograr un sellado hermético en conjunto con la gutapercha (Hauman & Love, 2003).

Hoy en día, existe una amplia variedad de selladores endodónticos con distintas características y marcas. Por tal razón, es importante contar con un sellador que posea propiedades bacteriostáticas o bactericidas, con la finalidad de bajar la carga bacteriana que permanecen dentro de los tejidos y conductos perirradiculares, luego de los protocolos de conformación, mecánicos y químicos (Alves Silva et al., 2020).

Por lo tanto, este estudio investiga la capacidad antimicrobiana del Enterococcus Faecalis en los cementos hidráulicos, BioRoot y Bio-C Sealer utilizados en tratamientos endodónticos mediante la experimentación *invitro*.

Metodología

Diseño experimental

Se desarrolló un estudio *in vitro,* de tipo observacional, descriptivo y experimental, realizado en el Laboratorio de Microbiología General de la Universidad Hemisferios, que dispone de los normas de seguridad necesarios para el cultivo, siembra y antibiograma de la cepa analizada.

El análisis microbiológico se realizó en agar Mueller-Hinton, con un total de 48 muestras, divididas en 3 grupos: Grupo I BioRoot (Septodont), Grupo II Bio-C Sealer (Ángelus) y Grupo control (Ampicilina), que se colocaron en pocillos de 3 mm de diámetro y se mezclaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se incubaron las cajas Petri 37°C durante los periodos de las 24, 48 y 72 horas, donde se midieron los halos de inhibición bacteriana.

Consecuentemente, los resultados obtenidos serán analizados mediante la prueba estadística RStudio y posterior la de Mann – Whitney.

Activación y caracterización del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Para la activación de bacteria, se siguió el protocolo descrito por Morrison: se raspo un poco de hielo de la superficie del medio de la bacteria congelada con un hisopo estéril y se colocó en una caja Petri con agar nutritivo nuevo, luego se procedió a colocar en la incubadora a 37°C por 24 horas. Después del tiempo transcurrido, se observaron las colonias y se caracterizaron mediante tinción Gram. La morfología se confirmó observando las células teñidas en el microscopio. Posteriormente, se realizó un cultivo por estriado para aislar colonias y con dichas colonias puras se hizo el experimento. Una vez obtenidas las colonias de cultivo de la cepa de *E. faecalis* ATCC 29212 se realizó una identificación de género y especie. Para determinar el género, se realizó pruebas bioquímicas como: catalasa, hemolisis, NaCl 6,5 %, determinación de movilidad, agar sangre y bilis esculina; luego, se llevaron a cabo pruebas específicas para determinar la especie, entre las que se incluyeron la acidificación de arabinosa (caldo rojo de fenol, arabinosa 5 g/l, pH 7.3+-02) y tolerancia a telurito (agar tripticasa de soya, telurito de potasio 0,04%, pH 7.3+-02).

Análisis del efecto antimicrobiano de los cementos Bio – C Sealer y BioRoot, sobre *E. faecalis* ATCC 29212

El método comenzó con la activación de la cepa y la preparación de la suspensión McFarland 0,5, seguida de siembras masivas utilizando el asa de Digralsky. La cepa bacteriana se sembró en agar Mueller-Hinton, realizando tres repeticiones con movimientos contiguos y horizontales. Cada caja de agar se dividió en cuatro secciones, con un diámetro de 3mm para cada pocillo.

Para evitar la dispersión del cemento, se selló la base de cada pocillo con 30 µl de agar. Luego se prepararon los cementos Bio-C Sealer y BioRoot, siguiendo las instrucciones del fabricante. Del Bio-C Sealer se colocó, directamente en cada pocillo, la cantidad de115

µl, mientras que el BioRoot se preparó con una mezcla homogénea (5 gotas liquido + 1 cucharada de polvo) y se dispersó en cada pocillo 115 µl.

Después de colocar los cementos endodónticos y los controles (discos de ampicilina), las muestras fueron incubadas en un ambiente anaerobio a 37°C durante los periodos de 24, 48 y 72 horas. En cada periodo de incubación, se analizó la formación de la zona de inhibición, se realizó de tres mediciones por muestra, utilizando un calibrador (pie de rey) digital. Los resultados se registraron en una hoja de cálculo y se sometieron al análisis estadístico para determinar la efectividad antimicrobiana de los cementos endodónticos.

Resultados

Mediante pruebas bioquímicas se logró identificar la especie de *Enterococcus faecalis* (Tabla1). Los resultados de estas pruebas revelaron una serie de características distintivas incluyendo: catalasa (-), gamma hemolisis, NaCl 6,5 % (+), determinación de movilidad (-), agar sangre y bilis esculina (+). Los resultados de las pruebas específicas para determinar la especie fueron: acidificación de arabinosa (-) y tolerancia a telurito positiva (agar telurito 0,04 %).

Los resultados estadísticos fueron analizados mediante la prueba de Shapiro -Wilk (prueba normalidad) en el grupo I Bio-C Sealer y al grupo II BioRoot en diferentes intervalos de tiempo a las 24, 48 y 72 horas. Sin embargo, se realizó una prueba adicional de Anderson Darlyn en el grupo de 72 horas del Bio–C Sealer para confirmar la normalidad (Tabla 2 y 3). Los hallazgos de las mediciones de los halos de inhibición revelaron las medias, a las 24 horas, del Bio-C Sealer de 10,2 mm, mientras que para BioRoot fue de 8,37mm. A las 48 horas se observaron medias de 10,61mm en el Bio-C Sealer y 9,55mm en el BioRoot y a las 72 horas, fueron de 11,02mm y 9,66mm para los cementos el Bio-C Sealer y BioRoot, respectivamente (figura 1).

La efectividad antimicrobiana entre los cementos se analizó mediante Mann-Whitney, que demostró que, en las 24 horas, el Bio-C Sealer presentó una zona de inhibición significativamente mayor que el BioRoot ($p < 0,05$), con una diferencia media de 1,89 mm. De manera similar, en las 48 horas, el Bio-C Sealer continúa mostrando una zona de inhibición superior al BioRoot ($p < 0,05$), con una diferencia media de 0,97mm. Similarmente, a las 72 horas, el Bio-C Sealer mantuvo un halo de inhibición mayor ($p < 0,05$), con una diferencia media de 1,36 mm ($p< 0,05$). Estos resultados permitieron concluir que el Bio-C Sealer tiene un mayor efecto antimicrobiano más efectivo que el BioRoot, en todos los intervalos de tiempo analizados.

Tabla 1
Tabla de caracterización bioquímica de Enterococcus faecalis ATCC 29212

Especie	Arabinosa	Telurito	Movilidad	Pigmento
Enterococcus Faecalis	-	+	-	-

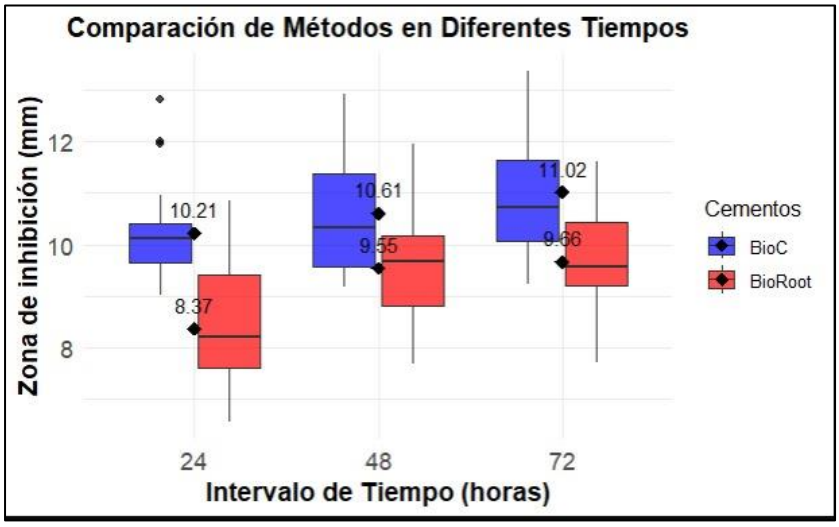
Tabla 2
Tabla estadística de Sharipo-Wilk de Bio-C Sealer (grupo I) a las 24,48 horas y adicional la de Anderson Darlyn a las 72horas.

Bio-C Sealer (Grupo I)	P-value	Normalidad
24horas	0,007	No normales
48horas	0,039	No normales
72horas	0,10	Normal

Tabla 3
Tabla estadística de Sharipo-Wilk de BioRoot (grupo II) a las 24,48 Y 72 hora.

BioRoot (Grupo II)	P-value	Normalidad
24horas	0,44	Normal
48horas	0,39	Normal
72horas	0,67	Normal

Figura 1.
Zona de inhibición bacteriana en diferentes intervalos de tiempo (Grupo I-II)



Discusión

Varias investigaciones demuestran la capacidad de persistencia y resistencia de bacterias Gram negativas como Gram positivas en la cavidad bucal; teniendo un impacto más significativo en el origen de la periodontitis apical, por ende, en fracasos endodónticos, *Enterococcus faecalis* con una prevalencia que varía entre el 14,06 % y el 77,8 % (Andrade et al., 2023).

Esta especie, posee características que le permiten sobrevivir en condiciones adversas para la mayoría de los microorganismos, como temperaturas elevadas y un pH extremadamente alcalino. Por tal razón, es resistente a los procedimientos biomecánicos y a la medicación intraconducto, teniendo la capacidad de adherirse al colágeno de las paredes de la dentina radicular y sobrevivir a estos protocolos (Andrade et al., 2023).

Actualmente, los selladores endodónticos han experimentado importantes avances científicos, lo que ha llevado a la introducción de materiales biocerámicos en endodoncia (Suwartini et al., 2022). Estos materiales presentan destacadas propiedades físicas y biológicas, debido a que contienen fosfato de calcio, lo que mejora sus características de fraguado y les otorga una composición química con una estructura cristalina comparable a la de la apatita presente en los dientes (Pushpa et al., 2016).

En el experimento llevado a cabo por Zhang y su equipo, se evaluó el efecto antimicrobiano de siete selladores endodónticos, utilizando la técnica de contacto directo en distintos intervalos de tiempo. Los resultados mostraron que el sellador biocerámico presentó el nivel más alto de actividad antimicrobiana entre las 24 horas; resultados que coinciden con los hallazgos de nuestro estudio (Zhang et al., 2015b).

Además, Colombo comparó en su estudio el efecto bactericida de los cementos biocerámicos frente *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. La zona de inhibición más alta se observó para EasySeal, seguido de BioRoot RCS y AH Plus, SealapexTM y MTA Fillapex mostraron menor actividad antimicrobiana en comparación con los demás, datos concordantes con nuestro estudio (Colombo et al., 2018).

En un estudio similar, compararon las propiedades antibacterianas de tres selladores a base de silicato de calcio: Endosequence/BC Sealer, CeraSeal y BioRoot RCS. Se observó que BioRoot RCS presentó mayor actividad antimicrobiana, mientras que CeraSeal tuvo la

más baja. Estos resultados que difieren de los obtenidos en nuestra investigación, pues esta discrepancia podría atribuirse a diferencias en la cepa bacteriana utilizada y en el procedimiento empleado (Abduljabbar & Abumostafa, 2021).

En nuestro estudio, se comprobó que el cemento Bio-C Sealer presentó el efecto antibacteriano más significativo contra *E. faecalis.* Estos resultados también coinciden con los obtenidos en una investigación realizada por Barbosa y colaboradores, quienes identificaron que el Bio-C Sealer mostró efecto antibacteriano ante la cepa de *E. faecalis, E. coli, Pseudomonas aeruginos*a, aunque no frente a *Streptococcus mutans* (Barbosa et al., 2020).

En el estudio de Raouf, evidencia que el Bio-C Sealer mostro la mayor activida antibacteriana frente a *E. faecalis,* aunque su efecto fue menos efectivo contra *S. aureus.* Por otro lado, el MTA-Fillapex presentó el efecto antibacteriano más significativo, estos hallazgos son consistentes con los de nuestro estudio, donde el Bio-C Sealer demostró mejor actividad antimicrobiana frente a *E. faecalis* (Raouf et al., 2023).

Conclusiones

De acuerdo con lo analizado, se encontró que los selladores biocerámicos demostraron actividad antibacteriana frente *al Enterococcus faecalis ATCC 29212*, teniendo mayor acción antimicrobiana el grupo I (Bio-C Sealer) a las 24 h, 48 h y 72 h, sobre el grupo II BioRoot.

Se recomienda realizar más estudios sobre estos dos cementos biocerámicos, Bio-C Sealer y BioRoot para determinar la actividad antimicrobiana contra microorganismo Enterococcus faecalis.

Referencias

Abduljabbar, S. M., & Abumostafa, A. (2021). Antimicrobial effect of different calcium silicate – Based bioceramic endodontic sealers against Enterococcus faecalis. *Saudi Journal of Oral Sciences*, *8*(1), 48–52. https://doi.org/10.4103/sjos.sjoralsci_95_20

Alves Silva, E. C., Tanomaru-Filho, M., da Silva, G. F., Delfino, M. M., Cerri, P. S., & Guerreiro-Tanomaru, J. M. (2020). Biocompatibility and Bioactive Potential of New Calcium Silicate–based Endodontic Sealers: Bio-C Sealer and Sealer Plus BC. *Journal of Endodontics*, *46*(10), 1470–1477. https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.07.011

Andrade, T. P. S., Barroso, L. S., Amaral, M., Siliva Concilio, L. R., Pinto, C. A., & Baroudi, K. (2023). Evaluation of the Antimicrobial Effect on Enterococcus Faecalis of Bioceramic Cements with and without Silver Nanoparticles. *European Journal of Prosthodontics and Restorative Dentistry*, *31*(2), 145–151. https://doi.org/10.1922/EJPRD_2432Andrade07

Armenta-Molina, J., Olivares-Acosta, I., & Candolfi-Arballo, O. (2022). Inhibición in vitro del crecimiento de enterococcus faecalis empleando cementos para endodoncia. *REVMEDUAS*, *12*(4), 299–308. https://doi.org/10.28960/revmeduas.2007-8013.v12.n4.004

Barbosa, V. M., Pitondo-Silva, A., Oliveira-Silva, M., Martorano, A. S., Rizzi-Maia, C. de C., Silva-Sousa, Y. T. C., de Castro-Raucci, L. M. S., & Neto, W. R. (2020). Antibacterial activity of a new ready-to-use calcium silicate-based sealer. *Brazilian Dental Journal*, *31*(6), 611–616. https://doi.org/10.1590/0103-6440202003870

Colombo, M., Poggio, C., Dagna, A., Meravini, M. V., Riva, P., Trovati, F., & Pietrocola, G. (2018). Biological and physico-chemical properties of new root canal sealers. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, *10*(2), 20–26. https://doi.org/10.4317/jced.54548

Diaz M, R. C. R. (2010). Fundamental features on he Enterococcus genus as a very important pathogen at present time. *Revista Cubana de Higiene y Epidiologia*, *48*, 147–161.

Hauman, C. H. J., & Love, & R. M. (2003). *Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root-canal-filling materials Orthograde root-canal-filling materials*.

Kirthiga, M., Thomas, G., Jose, S., Adarsh, V. J., & Nair, S. (2024). Antimicrobial efficacy of calcium silicate-based bioceramic sealers against Enterococcus faecalis and Staphylococcus aureus - An in vitro study. *Journal of Conservative Dentistry and Endodontics*, *27*(7), 737–742. https://doi.org/10.4103/JCDE.JCDE_215_24

Pushpa, S., Sawhny, A., Singh, A., Ashraf, F., & Sa, N. (2016). The Advent of Bioceramics in Dentistry: A Review. *Journal of Dental Sciences*, *3*(1), 2. https://doi.org/DOI:10.21275/SR23612172321

Raouf, S. H., Bakr, D. K., Ahmed, U. M., & Amin, B. K. (2023). In vitro evaluation of the antibacterial effects of MTA-Fillapex and BIO-C® sealer at different time intervals. *Cellular and Molecular Biology*, *69*(4), 116–119. https://doi.org/10.14715/cmb/2023.69.4.18

Suwartini, T., Santoso, J., Widyarman, A., & 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

Zhang, C., Du, J., & Peng, Z. (2015a). Correlation between Enterococcus faecalis and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. In *Journal of Endodontics* (Vol. 41, Issue 8, pp. 1207–1213). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.04.008

Zhang, C., Du, J., & Peng, Z. (2015b). Correlation between Enterococcus faecalis and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. In *Journal of Endodontics* (Vol. 41, Issue 8, pp. 1207–1213). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.04.008