

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Dissertação de Mestrado

PROPRIEDADES QUÍMICAS DO CIMENTO AH PLUS BIOCERÂMICO E SEU
EFEITO NA OSTEOCLASTOGÊNESE: UM ESTUDO *IN VITRO*.

Gustavo Gomes de Lima

Brasília 07 de dezembro de 2024

Gustavo Gomes de Lima

PROPRIEDADES QUÍMICAS DO CIMENTO AH PLUS BIOCERÂMICO E SEU
EFEITO NA OSTEOLASTOGÊNESE: UM ESTUDO *IN VITRO*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia

Orientadora: Prof. Dra. Loise Pedrosa Salles

Brasília, 2024

Gustavo Gomes de Lima

PROPRIEDADES QUÍMICAS DO CIMENTO AH PLUS BIOCERÂMICO E SEU
EFEITO NA OSTEOLASTOGÊNESE: UM ESTUDO *IN VITRO*.

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Data da defesa: 16 de dezembro de 2024

Banca examinadora:

Prof. Dr. Loise Pedrosa Salles (Orientadora)

Prof. Dr. Taia Maria Berto Rezende

Prof. Dr. Cleomar Donizeth Rodrigues

Prof. Dr. Laudimar Alves de Oliveira

À minha família: aos meus pais, Rita e José, por sempre me apoiarem e investirem na minha formação, mesmo em tempos difíceis, e à minha irmã, por me incentivar constantemente e por ajudar meus pais quando não pude. Ao meu parceiro de vida, Keven, por sempre estar ao meu lado. À memória de Juliana e Gustavo, que partiram cedo demais, mas sei que, de onde estiverem, estão felizes por esta conquista. Sem vocês, nada disso teria sido possível.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Loise Pedrosa Salles, minha orientadora, expresso minha profunda gratidão pelos ensinamentos transmitidos ao longo deste percurso do mestrado. Sua dedicação incansável, sempre disposta a me orientar independentemente do horário, e seu constante incentivo para que eu buscasse meus objetivos com determinação e excelência, foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Manifesto também meus sinceros agradecimentos à professora Taia Maria Berto Rezende e ao grupo de pesquisa Biodonto, que me proporcionaram o primeiro contato com o universo da pesquisa científica durante a graduação. Os conhecimentos adquiridos junto a eles foram essenciais para a condução dos experimentos realizados ao longo deste mestrado, e a todos sou eternamente grato por essa base sólida e enriquecedora.

Aos meus pais e à minha irmã, minha eterna gratidão pelo apoio incondicional e pelo carinho demonstrado em cada etapa desta jornada. Vocês foram fundamentais para que eu alcançasse este objetivo, e meu agradecimento jamais será suficiente para expressar o quanto sou grato por tudo o que fizeram.

Estendo meus agradecimentos ao Rafael Brasil, por sua parceria no laboratório e pela constante disposição em me auxiliar sempre que necessário, e ao colega de pós-graduação Marcos Coelho Santiago, pelo suporte prestado tanto dentro quanto fora do laboratório.

Ao meu parceiro de vida, Keven, agradeço profundamente por seu apoio, por estar ao meu lado nos momentos mais desafiadores e por nunca me deixar desistir, renovando sempre minha coragem e minha determinação.

Por fim, expresso meu carinho e minha gratidão aos amigos, que sempre estiveram presentes nos momentos cruciais, celebrando comigo cada conquista e me fazendo acreditar que todos os sonhos são possíveis.

A todos, o meu mais sincero e profundo agradecimento.

RESUMO

O tratamento endodôntico é composto por diversas etapas fundamentais, que vão desde a limpeza e modelagem do sistema de canais radiculares até a fase final de obturação, etapas as quais são cruciais para o sucesso a longo prazo do tratamento. Além de propriedades de selamento adequadas, o material obturador de canais radiculares deve estimular ou induzir o reparo dos tecidos remanescentes nos sistemas de canais radiculares. Nesse contexto, os cimentos obturadores de canais radiculares evoluíram em sua composição ao longo do tempo, onde os cimentos biocerâmicos emergiram como uma inovação significativa na estimulação à mineralização e osteogênese. A literatura demonstra uma interação positiva desse tipo de material com os tecidos circundantes, contribuindo para a reparação e regeneração óssea, que é de extrema importância especialmente no tratamento de casos com diagnóstico de necrose e lesão apical. O AH Plus Biocerâmico (AHP-BIO) é um cimento biocerâmico, composto principalmente por dióxido de zircônia e silicato tricálcico que surgiu como uma melhoria de sua formulação original, associando as boas propriedades que o AH Plus apresentava com a bioatividade de um cimento biocerâmico. Tal cimento apresenta em sua formulação baixa proporção de silicatos de cálcio e a presença de dimetilsulfóxido e traços de carbonato de lítio, alterações que podem impactar no seu efeito. Assim, este estudo objetivou realizar a investigação de propriedades químicas e do efeito biológico do AHP-BIO, um cimento endodôntico lançado no ano de 2022. O trabalho foi estruturado em três capítulos. No primeiro capítulo, realizou-se uma revisão da literatura sobre os cimentos biocerâmicos, destacando suas características, composição e vantagens para o tratamento endodôntico. O segundo capítulo avaliou as propriedades químicas do AHP-BIO, revelando sua capacidade de liberação de íons de cálcio e manutenção de um pH alcalino, fatores associados à biocompatibilidade e potencial mineralizador do material. No terceiro capítulo, foi estudado o impacto do AHP-BIO na osteoclastogênese em culturas de células RAW 264.7. Os resultados indicaram que o AHP-BIO aumentou a expressão de genes envolvidos no processo de reabsorção óssea, e inibiu a via Wnt com baixa expressão das proteínas c-Myc e MMP-7. Além disso, observou-se um aumento na quantidade de osteoclastos multinucleados, sugerindo que o AHP-BIO estimula a atividade osteoclástica. Os achados evidenciam o potencial do AHP-BIO como material endodôntico, mas indicam cautela em casos com necessidade de controle da osteoclastogênese. Este estudo contribui assim para a seleção clínica criteriosa de cimentos biocerâmicos com base em evidências científicas de suas propriedades e efeitos biológicos.

Palavras-chave: Endodontia; teste de biocompatibilidade; propriedades químicas; cimento endodôntico; osteoclastos; osteoclastogênese.

ABSTRACT

Endodontic treatment consists of several fundamental steps, ranging from cleaning and shaping the root canal system to the final obturation phase, steps that are crucial for the long-term success of the treatment. In addition to adequate sealing properties, the root canal filling material must stimulate or induce the repair of the remaining tissues in the root canal systems. In this context, root canal filling sealers have evolved in their composition over time, where bioceramic sealers have emerged as a significant innovation in stimulating mineralization and osteogenesis. The literature demonstrates a positive interaction of this type of material with the surrounding tissues, contributing to bone repair and regeneration, which is extremely important especially in the treatment of cases diagnosed with necrosis and apical lesion. AH Plus Bioceramic (AHP-BIO) is a bioceramic sealer, composed mainly of zirconia dioxide and tricalcium silicate, which emerged as an improvement of its original formulation, associating the good properties that AH Plus presented with the bioactivity of a bioceramic sealer. This sealer has in its formulation a low proportion of calcium silicates and the presence of dimethyl sulfoxide and traces of lithium carbonate, changes that may impact its effect. Thus, this study aimed to investigate the chemical properties and biological effect of AHP-BIO, an endodontic sealer launched in 2022. The work was structured in three chapters. In the first chapter, a review of the literature on bioceramic sealers was conducted, highlighting their characteristics, composition, and advantages for endodontic treatment. The second chapter evaluated the chemical properties of AHP-BIO, revealing its capacity to release calcium ions and maintain an alkaline pH, factors associated with the biocompatibility and mineralizing potential of the material. The third chapter studied the impact of AHP-BIO on osteoclastogenesis in RAW 264.7 cell cultures. The results indicated that AHP-BIO increased the expression of genes involved in the bone resorption process and inhibited the Wnt pathway with low expression of c-Myc and MMP-7 proteins. In addition, an increase in the number of multinucleated osteoclasts was observed, suggesting that AHP-BIO stimulates osteoclastic activity. The findings demonstrate the potential of AHP-BIO as an endodontic material but indicate caution in cases requiring control of osteoclastogenesis. This study thus contributes to the careful clinical selection of bioceramic sealers based on scientific evidence of their properties and biological effects.

Keywords: Endodontics; biocompatibility test; chemical properties; endodontic sealer; osteoclasts; osteoclastogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 2

Figura 1 - Gráfico de liberação de cálcio	51
Figura 2 - Gráfico do ensaio de <i>Alizarin Red S Staining</i>	52
Figura 3 - Gráfico de mensuração do pH.....	52
Figura 4 - Gráfico de total de sólidos dissolvidos	53

Capítulo 3

Tabela 1 - Sequências de primers forward e reverse utilizados para qPCR	69
Figura 1 - Gráfico de viabilidade celular.....	71
Figura 2 - Gráfico de área do <i>Wound Healing</i> coberta por células.....	72
Figura 3 - Gráficos de diferenciação osteoclástica TRAP-positivas.....	73
Figura 4 - Gráficos de expressão dos genes CTSK, MMP-9 e ACP5.....	74
Figura 5 - Imagens de <i>Western blotting</i>	75

TABELA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHP-BIO	AH Plus Biocerâmico
ARS	Coloração de nódulos de cálcio por vermelho de Alizarina
B-ACTIN	Beta actina
c-Myc	Proto-oncogene myc
Ca ²⁺	Cálcio
CATEPSIN	Catepsina
cDNA	DNA complementar
CSSs	Cimentos a base de silicato de cálcio
CT	Grupo controle
DC-STAMP	Proteína transmembrana específica de células dendríticas
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPSCs	Células-tronco da polpa dentária
hPDLF	Fibroblastos do ligamento periodontal humano
hPDLSCs	Células-tronco do ligamento periodontal humano
IL-1	Interleucina-1
IL-3	Interleucina-3
ISO	Organização Internacional de Padronização
qPCR	PCR em tempo real
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MMP-7	Matrix metalloproteinase 7
MMP-9	Matrix metalloproteinase 9
MTA	Agregado de Trióxido Mineral
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NFATc1	Fator nuclear de células T ativadas 1
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPG	Osteoprotegerina
PBS	Solução tampão fosfato-salino
Ppm	Partes por milhão
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa B

RANK L	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
RAW 264.7	Linhagem celular derivada de macrófagos murinos
RNA	Ácido Ribonucleico
Saos-2	Linhagem celular osteoblástica humana
SFB	Soro fetal bovino
TDS	Sólidos totais dissolvidos
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO, REVISÃO DE LITERATURA E OBJETIVOS ..	14
1.1 INTRODUÇÃO	14
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	19
1.2.1 História e Evolução dos Cimentos Biocerâmicos	19
1.2.2 Cimentos Biocerâmicos: Conceito e Características	20
1.2.3 Composição e Propriedades dos Cimentos Biocerâmicos	20
1.2.4 Tipos de Cimentos Biocerâmicos	22
1.2.5 Aplicações dos Cimentos Biocerâmicos	24
1.2.6 Vantagens e Desvantagens	25
1.2.7 Cimento AH Plus Biocerâmico.....	26
1.2.8 Osteoclastogênese: Mecanismos e Relevância	27
1.2.9 Interação entre Cimentos Biocerâmicos e Osteoclastogênese	29
1.3 OBJETIVOS.....	32
1.3.1 Objetivo Geral.....	32
1.3.2 Objetivos Específicos	32
1.4 REFERÊNCIAS.....	34
2. CAPÍTULO 2 – PROPRIEDADES QUÍMICAS DO CIMENTO AH PLUS BIOCERÂMICO	44
2.1 INTRODUÇÃO	46
2.2 METODOLOGIA	48
2.3 RESULTADOS.....	50
2.4 DISCUSSÃO	53
2.5 CONCLUSÃO	56
2.6 REFERÊNCIAS.....	57
3. CAPÍTULO 3 – EFEITO DO CIMENTO AH PLUS BIOCERÂMICO NA OSTEOCLASTOGÊNESE: UM ESTUDO IN VITRO	62
3.1 INTRODUÇÃO	64
3.2 METODOLOGIA	65
3.3 RESULTADOS.....	71
3.4 DISCUSSÃO	75
3.5 CONCLUSÃO	80
3.6 REFERÊNCIAS.....	81

4. CAPÍTULO 4	86
4.1 DISCUSSÃO GERAL.....	86
4.2 CONCLUSÕES	88
5. CAPÍTULO 5 – Press Release.....	89

CAPÍTULO 1

1. CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO, REVISÃO DE LITERATURA E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

A polpa dentária é um tecido conjuntivo especializado que se localiza no interior do elemento dental e desempenha um papel muito importante na saúde e função do dente [1]. A polpa é composta por vasos sanguíneos, nervos e diferentes tipos celulares, como fibroblastos, odontoblastos e células imunes, que são responsáveis pelas suas diversas funções [1]. Dentre as principais funções do tecido pulpar pode-se citar a formação de dentina reparadora, a percepção sensorial, a resposta imune frente a patógenos e a manutenção da vitalidade [1]. A polpa dentária apresenta um papel significativo na resposta imune, pois suas células imunes, incluindo linfócitos e macrófagos, são essenciais no combate a infecções e na manutenção da homeostase desse tecido [2]. Em casos de lesão ou inflamação, a polpa é capaz de induzir uma resposta reparadora que envolve a secreção de fatores de crescimento e citocinas para promoção de reparo e/ou regeneração local [3].

A integridade do tecido pulpar pode ser comprometida por diversos fatores. Dentre os principais fatores que ameaçam a integridade da polpa dentária, pode-se citar as infecções bacterianas e traumas [4]. Infecções bacterianas, em especial aquelas decorrentes de lesões cariosas, estão entre as causas mais comuns da pulpite, condição inflamatória da polpa dentária [5]. Quando as bactérias penetram na dentina e atingem o tecido pulpar, elas desencadeiam uma resposta imune caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios, como interleucinas e o fator de necrose tumoral (TNF- α) [5]. Tal inflamação pode acarretar a danos irreversíveis, resultando em necrose pulpar se não for tratada prontamente [6]. Já os traumas, seja por lesão física ou por iatrogenias durante procedimentos odontológicos, também podem impactar severamente a polpa dentária. Estresses mecânicos podem induzir um processo inflamatório que altera o microambiente da polpa, afetando a diferenciação e a função das células-tronco da polpa dentária (DPSCs), que são importantes no processo regenerativo [7]. Em casos de trauma grave, o tecido pode ficar exposto, propiciando a invasão bacteriana direta que pode levar a subsequente pulpite [8]. Além disso, a resposta inflamatória frente ao trauma pode resultar em um aumento da morte das células pulpares, diminuindo ainda mais a sua capacidade

regenerativa [9].

Assim, o comprometimento da integridade da polpa pode acarretar uma inflamação que pode progredir para pulpíte irreversível, que é caracterizada por dor intensa e que pode evoluir para necrose pulpar [10]. Além disso, a incapacidade da polpa de se regenerar, em decorrência da perda de função das células-tronco pode dificultar ainda mais o processo de reparo, podendo levar a complicações adicionais, como a formação de abscessos ou até mesmo o desenvolvimento de infecções sistêmicas [4]. Portanto, manter a integridade da polpa dentária é crucial para preservar sua vitalidade e função. Pois quando comprometida, muitas vezes é necessário a realização de tratamento endodôntico que visa a remoção do tecido necrosado ou inflamado, seguido de desinfecção e preparo mecânico do sistema de canais radiculares com posterior preenchimento utilizando um material selador para obtenção do selamento bacteriano, procedimento denominado obturação [11]. A obturação é essencial para evitar a reinfecção e promover o reparo dos tecidos periapicais circundantes [11]. Assim, o tratamento endodôntico visa a preservação do elemento dentário, reestabelecendo sua função e prevenindo a necessidade de exodontia que pode resultar em danos estéticos e funcionais para o paciente [11].

O tratamento endodôntico tem como principal obtivo realizar a diminuição da carga bacteriana e virulência microbiana do sistema de canais radiculares, pois a infecção bacteriana é uma das principais causas de periodontite apical [12]. O material selecionado para o procedimento de obturação deve fornecer um vedamento eficiente para evitar a entrada de bactérias e fluidos da cavidade oral no sistema de canais radiculares [12]. Materiais como a guta-percha, combinados com os cimentos endodônticos, são comumente empregados devido à sua biocompatibilidade e capacidade de criação de um vedamento [13]. A qualidade de tal vedamento é primordial, pois estudos demonstraram que o vedamento inadequada pode levar à falha do tratamento e à recorrência da doença periapical [14]. Portanto, dentre todas as etapas do tratamento endodôntico, os procedimentos de obturação são essenciais para obtenção de isolamento bacteriano a fim de prevenir sua proliferação e impedir complicações futuras [15]. Assim, o reparo de ápices abertos, perfurações e reabsorções radiculares demonstram um desafio, devido a dificuldade de realizar tal selamento e por demandar a formação de tecido mineralizado para completa reparação da região periapical [16]. Uma das causas de insucesso mais comuns nos tratamentos endodônticos está relacionada a uma falha decorrente de um selamento

inadequado do sistema de canais radiculares [17]. Além de fornecer o isolamento bacteriano, o material utilizado na obturação também deve auxiliar e permitir a cicatrização dos tecidos periapicais [13]. A escolha desse material pode influenciar a resposta biológica dos tecidos circundantes. Por exemplo, materiais biocerâmicos demonstraram promover a regeneração de tecidos periapicais além de possuir propriedades antimicrobianas, tornando-os uma opção muito favorável nos tratamentos endodônticos [13]. Assim, escolher o material adequado para obturação contribui para o sucesso a longo prazo dos tratamentos endodônticos [18–20].

Os cimentos biocerâmicos representam um avanço significativo, são caracterizados por sua composição e propriedades que aumentam a eficácia dos tratamentos de canal radicular [21]. Esses cimentos são compostos principalmente de silicato de cálcio, que conferem ótima bioatividade, biocompatibilidade e estabilidade mecânica [21]. Sua formulação permite que eles interajam favoravelmente com o microambiente do elemento dental, tornando-os adequados para um selamento eficaz dos canais radiculares [21,22]. A função desses cimentos é de preencher, juntamente com a guta-percha, o espaço deixado após a remoção de tecido pulpar infectado ou necrótico, prevenindo a reinfecção e promovendo a cicatrização dos tecidos periapicais [23,24]. Os biocerâmicos são particularmente valorizados por sua capacidade de criar um selamento hermético que é crucial para manutenção da integridade do sistema de canais radiculares [22]. Estudos demonstraram que tais cimentos apresentaram capacidade de selamento superior quando comparados aos materiais tradicionais, como os cimentos à base de resina epóxi, em decorrência da sua baixa solubilidade em fluidos orais e da sua hidrofobicidade [22]. A importância dos cimentos biocerâmicos na odontologia, especialmente na endodontia, pode ser atribuída a diversos fatores. Primeiro, sua excelente biocompatibilidade diminui o risco de reações adversas nos tecidos circundantes [24]. Além disso, os cimentos biocerâmicos promovem a formação de hidroxiapatita, o que facilita sua ligação com a dentina, aumentando a eficácia geral do selamento obtido com o seu uso [25]. E essa propriedade bioativa não auxilia apenas no selamento, mas também ajuda na regeneração dos tecidos periapicais circundantes, tornando os biocerâmicos muito benéficos em casos de necrose pulpar ou na presença de lesões periapicais [26]. As propriedades mecânicas dos cimentos biocerâmicos, como sua estabilidade dimensional e fluidez, também contribuem para sua eficácia. Eles são projetados para escoar nos espaços de difícil acesso do sistema de canais radiculares, garantindo

assim uma cobertura total e minimizando os vazios que podem abrigar bactérias [27]. Ademais, a capacidade dos cimentos biocerâmicos de liberar íons de cálcio aumenta ainda mais sua bioatividade atuando no reparo dos tecidos circundantes [28].

Portanto, o estudo das propriedades químicas e efeitos desses cimentos biocerâmicos é crucial para melhorar a indicação de uso dos diferentes materiais disponíveis no mercado [29]. Os biocerâmicos usados em endodontia facilitam o reparo ósseo, sua semelhança com o processo de formação da hidroxiapatita permite uma ligação eficaz com as estruturas dentárias, que promove uma melhor resposta regenerativa [30]. Essa biocompatibilidade é essencial por garantir que os materiais não provoquem reações adversas ao entrar em contato com os tecidos biológicos [31,32]. Esses materiais tem a capacidade de absorver substâncias osteoindutoras durante o processo de reparo ósseo, o que posteriormente estimula a formação de tecido mineralizado [33]. Estudos demonstraram que alguns biocerâmicos podem inibir a osteoclastogênese enquanto promovem a diferenciação osteogênica, o que facilita a regeneração óssea [34]. Essa ação dupla é essencial, pois além de induzir a formação de novo tecido ósseo, também diminui a atividade reabsortiva dos osteoclastos, que pode impedir a cicatrização óssea [34,35]. A interação entre cimentos biocerâmicos e osteoclastos é uma importante área de pesquisa, onde os mecanismos pelos quais os materiais biocerâmicos afetam os osteoclastos ainda podem ser melhor elucidados. Por exemplo, as propriedades superficiais dos biocerâmicos podem influenciar significativamente o comportamento dos osteoclastos, incluindo sua atividade de reabsorção e sua diferenciação [36]. O entendimento dessas interações é muito importante para melhorar o design de materiais e aumentar a eficácia dos biocerâmicos em aplicações clínicas, particularmente em casos que envolvem perda óssea [36].

Um cimento biocerâmico relativamente novo no mercado é o AH Plus Biocerâmico (AHP-BIO; Dentsply Sirona, Ballaigues, Switzerland). O AHP-BIO é um cimento biocerâmico pré-misturado composto principalmente por dióxido de zircônia (50-70%) como radiopacificador e silicato tricálcico (10-15%) como componente bioativo [28,37,38]. De acordo com informações do fabricante, o AHP-BIO apresenta capacidade de selamento superior; biocompatibilidade; atividade antimicrobiana; propriedades físicas excelentes; alta resistência a lavagem; e não descolore o dente [39–41]. Diferentemente de outros biocerâmicos disponíveis no mercado, o AHP-BIO possui uma baixa proporção de silicatos de cálcio em sua composição, não

apresentando silicato dicálcico, e apresenta em sua formulação dimetilsulfóxido (DMSO) e traços de carbonato de lítio, o que não é conhecido de outros cimentos biocerâmicos [39,42]. O efeito do AHP-BIO na osteoclastogênese ainda não é elucidado, necessitando de uma investigação mais aprofundada. Embora o AHP-BOP já seja reconhecido por suas propriedades físico-químicas favoráveis, como baixa solubilidade e alta radiopacidade, suas interações específicas com osteoclastos e as consequentes implicações para a regeneração óssea ainda não foram estudadas [39,41]. A literatura atual traz resultados principalmente sobre as capacidades de vedamento e biocompatibilidade do material, com ênfase limitada em seus efeitos biológicos, principalmente no que diz respeito à diferenciação e atividade dos osteoclastos [38]. Os osteoclastos desempenham um papel fundamental nos processos de remodelação e cicatrização óssea, em especial no contexto de tratamentos endodônticos onde a regeneração óssea é essencial, como em casos de lesões periapicais. Diante do exposto, o objetivo geral desse estudo foi avaliar as propriedades químicas e os efeitos do AHP-BIO na osteoclastogênese. A fim de elucidar melhor suas propriedades e participação no processo de remodelação óssea. Este estudo têm relevância clínica na tomada de decisão pelo cimento obturador de canais radiculares ideal diante da condição endodôntica a ser tratada. Os resultados apresentados neste estudo podem garantir uma melhor escolha frente aos inúmeros cimentos biocerâmicos disponíveis no mercado atual.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 História e Evolução dos Cimentos Biocerâmicos

A evolução dos cimentos biocerâmicos reflete um avanço dos materiais odontológicos utilizados em endodontia visando melhorar os resultados clínicos após os tratamentos endodônticos. A jornada iniciou-se ao final do século XX com a introdução do Agregado de Trióxido Mineral (MTA), que foi desenvolvido inicialmente na década de 1990 [43]. O MTA foi primeiramente indicado como material retro obturador e para selamento de perfurações, sendo indicado em sequência também para capeamento pulpar e como material de obturação apical devido à suas propriedades de vedamento e ótima biocompatibilidade [43]. Esse material apresentava em sua formulação silicato tricálcico, silicato dicálcico e óxido de bismuto, o que forneceu uma base para o desenvolvimento dos materiais biocerâmicos subsequentes [44]. Após a introdução do MTA, as pesquisas se expandiram para diferentes formulações de biocerâmicos, a fim de melhorar as propriedades desses materiais [44]. O reconhecimento da bioatividade dos biocerâmicos, caracterizada pela interação favorável com os tecidos biológicos, foi um marco fundamental na terapia endodôntica [26]. Por exemplo, os materiais biocerâmicos possuem a capacidade de liberar íons de cálcio promovendo a formação de hidroxiapatita, o que foi associado ao seu potencial regenerativo, tornando esses materiais adequados para inúmeras aplicações clínicas além do selamento tradicional [45,46]. Tal bioatividade é indispensável para estimular os processos de cicatrização do hospedeiro, aumentando assim a previsibilidade dos tratamentos endodônticos [26].

Nos anos seguintes à introdução do MTA, diversos cimentos biocerâmicos foram desenvolvidos, podendo ser citados o Biodentine e o EndoSequence BC Sealer, onde tais materiais foram desenvolvidos com o intuito de abordar algumas das limitações associadas ao MTA, como as características de manuseio e tempo de presa [45]. O Biodentine, por exemplo, foi formulado para ter um menor tempo de presa, mantendo propriedades bioativas semelhantes ao MTA [45]. Caracterizando a evolução desses materiais focando em melhorar a sua biocompatibilidade, facilidade de uso em ambientes clínicos e aprimorar suas propriedades mecânicas [29,46]. Destaca-se também pesquisas com os biocerâmicos sobre o seu papel em aplicações clínicas específicas, como no reparo de perfurações radiculares e o procedimento de

apicificação em dentes imaturos com o ápice aberto [47]. Além disso, estudos também indicaram que os cimentos biocerâmicos demonstram menor citotoxicidade quando comparados aos materiais tradicionais, apoiando ainda mais sua utilização em procedimentos endodônticos sensíveis [48]. Com a evolução contínua da endodontia, a utilização de materiais biocerâmicos nas práticas clínicas é um reflexo de uma evolução crescente em direção à odontologia regenerativa. Estudos atuais sobre o uso e as propriedades dos biocerâmicos indicam que esses materiais terão muita importância na terapia endodôntica, especialmente com o surgimento de novas formulações e tecnologias [48].

1.2.2 Cimentos Biocerâmicos: Conceito e Características

Os cimentos biocerâmicos são uma classe de materiais biocompatíveis compostos principalmente por silicatos de cálcio que se assemelham às propriedades de tecidos biológicos, especialmente a hidroxiapatita, um componente chave das estruturas dentárias e ósseas [29,31]. Devido a essa semelhança, os cimentos biocerâmicos formam ligações químicas com os tecidos dentários, criando um ambiente propício à cicatrização e regeneração tecidual [29]. Esses materiais se destacam por apresentar bioatividade, biocompatibilidade e capacidade de induzir a osteogênese, o que os torna muito importantes para o sucesso em procedimentos endodônticos [29]. Além disso, são hidrofílicos, o que facilita sua interação com a dentina e promove um selamento eficiente dos canais radiculares, essencial para a prevenção de reinfecções [29,49]. Além de apresentar expansão higroscópica, característica que também contribui para um melhor vedamento dos canais após a presa do material [45].

1.2.3 Composição e Propriedades dos Cimentos Biocerâmicos

Cimentos biocerâmicos são compostos principalmente por silicato de cálcio e aditivos que são inseridos com o intuito de aprimorar suas propriedades [44]. O MTA, um dos primeiros biocerâmicos desenvolvidos, é constituído por silicato tricálcico, aluminato tricálcico, óxido de silicato, óxido de bismuto e outros óxidos [44]. Já os novos materiais, como o Biodentine e o EndoSequence BC Sealer, foram introduzidos

com melhoras em sua composição para obter resultados clínicos mais favoráveis [50]. O Biodentine contém silicato de cálcio e carbonato de cálcio, com aditivos patenteados que melhoram sua resistência mecânica e tempo de presa, sem comprometer a bioatividade [50]. O EndoSequence BC Sealer, por sua vez, combina silicato de cálcio com fosfato de cálcio, apresentando uma excelente capacidade de selamento e a formação de hidroxiapatita, aprimorando a sua interação com a dentina [29]. A composição química desses materiais favorece sua interação com os tecidos biológicos, aumentando seu potencial regenerativo e tornando-os ideais para diferentes casos em endodontia [47].

- Propriedades físico-químicas

Os cimentos biocerâmicos exibem inúmeras propriedades físico-químicas vantajosas. Possuem biocompatibilidade, minimizando reações adversas ao entrar em contato com os tecidos biológicos [31,45]. Apresentam pH alcalino (em média de 12,5), o que contribui para seus efeitos antimicrobianos além de promover a precipitação da hidroxiapatita, o que facilita sua ligação com a dentina aumentando a capacidade de selamento [30]. Além disso, os cimentos biocerâmicos apresentam baixa solubilidade e boa estabilidade dimensional, requisitos essenciais para manutenção da sua integridade a longo prazo no ambiente úmido do sistema de canais radicular [33,51]. Estudos recentes demonstram ainda a capacidade desses cimentos de facilitar a absorção de substâncias osteoindutoras durante o reparo ósseo, demonstrando sua função regenerativa [33]. A resistência mecânica, especialmente à compressão, também é influenciada pela composição química e pelas condições ambientais no momento da fixação [51].

- Propriedades antimicrobianas

O pH elevado dos cimentos biocerâmicos cria um ambiente hostil para a sobrevivência de microrganismos, sendo uma propriedade essencial para prevenir a reinfecção de canais tratados endodonticamente [30]. Estudos confirmam que esses materiais são eficazes na inibição do crescimento de patógenos endodônticos comuns, importante para se alcançar o sucesso do tratamento [52].

- Interação com tecidos ósseos e dentários

A interação dos cimentos biocerâmicos com os tecidos biológicos é um aspecto crucial para seu uso clínico. A formação de hidroxiapatita, após o contato com fluidos biológicos, é uma característica fundamental que contribui para a regeneração e a cicatrização tecidual [31]. Por exemplo, estudos verificaram que os cimentos

biocerâmicos são capazes de estimular a proliferação e mineralização de células da polpa dentária humana, indicando seu potencial na promoção de regeneração tecidual [53]. Estes cimentos demonstraram também facilitar a formação de uma ponte de dentina em casos de exposição pulpar, demonstrando sua eficácia na cicatrização do complexo polpa-dentina [45]. O potencial regenerativo desses materiais é ainda mais evidenciado por sua capacidade de indução de uma resposta biológica favorável em tecidos periapicais, o que é essencial para o sucesso de procedimentos endodônticos [54].

1.2.4 Tipos de Cimentos Biocerâmicos

Uma gama de matérias biocerâmicos está disponível para atender as diferentes aplicações clínicas. Os principais tipos de cimentos biocerâmicos incluem: MTA; Cimentos à base de silicato de cálcio; Cimentos à base de fosfato de cálcio; Cimentos à base de hidróxido de cálcio modificado; Cimentos à base de silicato de cálcio e alumínio; Cimentos biocerâmicos.

- Agregado de Trióxido Mineral (MTA)

O MTA é um cimento biocerâmico amplamente reconhecido por sua excelente biocompatibilidade, capacidade de vedamento e capacidade de promover a regeneração de tecidos duros [43]. O MTA é comumente utilizado nos procedimentos de capeamento pulpar, obturação apical e reparo de perfuração devido à sua capacidade de induzir mineralização e formação de hidroxiapatita em contato com fluidos teciduais [43]. Entretanto, o MTA possui algumas limitações, incluindo a possibilidade de descoloração do elemento dentário e longos tempos de presa, o que levou a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas [43,55].

- Cimentos à base de silicato de cálcio

Esta categoria inclui diferentes materiais, como BioRoot RCS e Biodentine, que foram projetados com o intuito de melhorar as propriedades do antecessor MTA [55]. Os cimentos à base de silicato de cálcio são conhecidos por possuir ótimas propriedades mecânicas, apresentar biocompatibilidade e capacidade de estimular a diferenciação osteogênica [55]. Tais materiais são empregados em procedimentos como apicificação, capeamento pulpar e utilizados como material de obturação do sistema de canais radiculares [55]. Seu mecanismo de fixação envolve a hidratação

de partículas de silicato de cálcio, o que resulta na formação de hidrato de silicato de cálcio, contribuindo assim para sua bioatividade [56].

- Cimentos à base de fosfato de cálcio

Esses cimentos são caracterizados pela capacidade de liberação de íons de cálcio e fosfato, o que leva à formação de hidroxiapatita [57]. Os cimentos à base de fosfato de cálcio podem facilitar a precipitação de depósitos de fosfato de cálcio, melhorando assim a capacidade de selamento dos materiais de obturação do canal radicular, além de serem particularmente benéficos em procedimentos cujo objetivo é melhorar a cicatrização dos tecidos periapicais [57].

- Cimentos à base de hidróxido de cálcio modificados

Esses cimentos combinam as propriedades do hidróxido de cálcio com outros materiais a fim de melhorar seu desempenho [58]. Porém, mantendo as características favoráveis do hidróxido de cálcio, como alto pH e presença de propriedades antibacterianas, ao mesmo tempo em que melhoram suas capacidades de selamento e manuseio [58]. Cimentos à base de hidróxido de cálcio modificados são normalmente empregados em capeamento pulpar e como cimentos obturadores de canais radiculares, proporcionando um equilíbrio entre resistência mecânica e atividade biológica [59].

- Cimentos à base de silicato de cálcio e alumínio

Este tipo de cimento incorpora a sua composição o silicato de alumínio, com intuito de melhorar as propriedades mecânicas e a bioatividade do material [60]. Cimentos à base de silicato de cálcio e alumínio possui uso potencial em aplicações endodônticas, particularmente em situações que exigem boa biocompatibilidade e forte vedamento [60]. O ajuste em sua composição, quando comparado ao MTA, permite melhor interação com os tecidos dentais e periapicais, promovendo melhor integração e cicatrização [60].

- Cimentos biocerâmicos

Os cimentos biocerâmicos, como o Endosequence BC Sealer, são projetados para uso em associação à guta-percha no procedimento de obturação do canal radicular [61]. Eles são compostos de uma combinação de silicatos de cálcio, fosfatos de cálcio e outros aditivos que tem por objetivo aumentar sua capacidade de selamento e biocompatibilidade [61]. Eles exibem altos níveis de pH, contribuindo com suas propriedades antibacterianas e auxiliando na cicatrização dos tecidos periapicais [61]. Os seladores biocerâmicos são cada vez mais favorecidos devido à sua

capacidade de penetração nos túbulos dentinários, além de fornecer um selamento superior quando comparados aos seladores tradicionais [61].

1.2.5 Aplicações dos Cimentos Biocerâmicos

Uma das principais aplicações dos cimentos biocerâmicos é no procedimento de obturação de canais radiculares, onde eles fornecem um selamento hermético prevenindo reinfecções [29]. O EndoSequence BC Sealer, por exemplo, conhecido por possuir propriedades físicas e químicas favoráveis, incluindo capacidade de expansão na presença de umidade e boa radiopacidade, o que melhora sua capacidade de selamento devido ao escoamento dentro dos túbulos dentinários [29]. Outra aplicação onde o uso dos cimentos biocerâmicos pode ser crítico, é no tratamento de dentes imaturos com ápices abertos. Esses materiais são aplicados para criação de uma barreira apical, possibilitando a conclusão do tratamento endodôntico em dentes não vitais com ápices abertos [45]. Foi demonstrado que os cimentos biocerâmicos são capazes de estimular efetivamente a formação de uma ponte de dentina, o que promove a cicatrização e a regeneração nesses casos mais desafiadores [45]. O potencial regenerativo dos cimentos biocerâmicos é ainda mais apoiado por sua capacidade de liberar íons de cálcio, o que aumenta a formação de hidroxiapatita que é um componente crucial na regeneração óssea e dentinária [24].

Além de seu uso nos procedimentos de obturação e apicificação, esses cimentos podem ser empregados em reparos de perfuração e como materiais de preenchimento retrógrado em cirurgias pararendodônticas [31]. Sua natureza bioativa possibilita que eles se liguem quimicamente à estrutura do dente, o que é imprescindível para manutenção da integridade do dente após intervenções cirúrgicas [31]. Além disso, exibem propriedades antibacterianas que são muito importantes no controle de infecção durante procedimentos endodônticos [31]. A combinação dessas propriedades torna os cimentos biocerâmicos uma escolha versátil possuindo diferentes aplicações na endodontia, contribuindo para maiores taxas de sucesso em tratamentos mais desafiadores [62]. O uso de cimentos biocerâmicos tem sido associado a melhores resultados clínicos em termos de biocompatibilidade e capacidade de selamento. Estudos demonstraram que esses materiais além de fornecer um bom vedamento contra a infiltração bacteriana, também auxiliam na

cicatrização dos tecidos periapicais, melhorando assim o prognóstico geral dos dentes com tratamento endodôntico [63].

1.2.6 Vantagens e Desvantagens

Os cimentos biocerâmicos oferecem inúmeras vantagens na endodontia. No entanto, como qualquer material, apresentam também algumas desvantagens quando comparados a outros tipos de cimentos usados na endodontia, como cimentos à base de resina, óxido de zinco e eugenol, ou cimentos à base de hidróxido de cálcio. Uma das principais vantagens está relacionada à sua excelente biocompatibilidade, atribuída à sua similaridade com materiais biológicos [29]. Essa propriedade confere uma integração eficaz com os tecidos circundantes, promovendo a cicatrização e a regeneração, além de reduzir o risco de reações adversas e inflamação [29–31]. Outra vantagem está relacionada às propriedades osteoindutoras e osteocondutoras, garantindo que os cimentos biocerâmicos possam estimular a regeneração óssea e formar tecidos mineralizados [29]. Materiais biocerâmicos, como o MTA e o Biodentine, já demonstraram capacidades de selamento superiores quando comparados aos materiais tradicionais, que são cruciais para prevenir micro infiltração e conseqüentemente falhas endodônticas subseqüentes [46]. Além disso, esses cimentos apresentam propriedades mecânicas favoráveis, incluindo a alta estabilidade dimensional, não sofrendo contração significativa durante sua presa, o que garante um vedamento estável e duradouro que é essencial para manutenção da integridade do sistema de canais radiculares mediante forças mastigatórias [31]. Sua natureza bioativa estimula também os processos naturais de remineralização, melhorando o reparo e cicatrização dos tecidos periapicais circundantes [64]. Ademais, os cimentos biocerâmicos possuem menor citotoxicidade em comparação aos materiais tradicionais, a liberação de íons de cálcio e sua capacidade de neutralizar ácidos conferem aos cimentos biocerâmicos uma toxicidade muito baixa, tornando-os mais seguros quando aplicados em procedimentos odontológicos mais sensíveis [65]. Cimentos à base de resina, por exemplo, podem liberar monômeros tóxicos em algumas condições, o que pode causar efeitos adversos [65].

Apesar de suas inúmeras vantagens citadas, os cimentos biocerâmicos também possuem algumas limitações. Uma desvantagem significativa é o custo

desses materiais, o que pode acabar limitando sua acessibilidade e conseqüentemente o uso na prática clínica [30]. Além disso, embora os cimentos biocerâmicos geralmente apresentem boas propriedades de vedamento, alguns estudos demonstraram que seu desempenho pode ser estatisticamente similar ao dos cimentos à base de resina epóxi, no que diz respeito à capacidade de vedamento e resistência à infiltração bacteriana [62]. Algumas formulações, como o MTA, também podem apresentar um tempo de presa relativamente lento, dificultando sua manipulação em certos procedimentos [66]. O manuseio e manipulação dos biocerâmicos também pode ser desafiador e sua aplicação no sistema de canais radiculares de forma correta é mais difícil em decorrência da sua viscosidade, o que pode exigir maior habilidade do dentista [66]. Outra preocupação é com a variabilidade nas propriedades mecânicas das diferentes formulações de cimentos biocerâmicos disponíveis no mercado atual, o que pode afetar seu desempenho clínico [66]. Por exemplo, enquanto alguns materiais exibem excelente resistência à compressão, outros podem não ser capazes de suportar o mesmo nível de estresse, resultando em falhas potenciais em diferentes cenários clínicos [66]. Além disso, há relatos na literatura sugerindo que a degradação e a desintegração de cimentos biocerâmicos ao longo do tempo podem levar à micro infiltração, prejudicando sua eficácia a longo prazo [67].

1.2.7 Cimento AH Plus Biocerâmico

O cimento AHP-BIO é um cimento contemporâneo para uso em endodontia como um selador de canais radiculares, sendo uma evolução do tradicional cimento AH Plus, com a adição de componentes bioativos que objetivam melhorar suas propriedades biológicas [37]. O AHP-BIO é um cimento biocerâmico pré-misturado composto principalmente por dióxido de zircônia (50-70%) como radiopacificador e silicato tricálcico (10-15%) como componente bioativo que foi desenvolvido para aprimorar os resultados clínicos com a combinação das propriedades bioativas de um biocerâmico com as vantagens de um cimento pré-misturado [37,68,69]. Diferentemente de outros biocerâmicos disponíveis no mercado, o AHP-BIO possui uma baixa proporção de silicatos de cálcio em sua composição, não apresentando silicato dicálcico, e apresenta em sua formulação dimetilsulfóxido (DMSO) e traços de

carbonato de lítio, o que não é conhecido de outros biocerâmicos [42,70]. A presença de silicato de cálcio, que é conhecido por seu potencial bioativo e capacidade de liberar íons cálcio e hidroxila após hidratação, garante ao AHP-BIO a capacidade de promover a mineralização além de aumentar a sua capacidade de selamento [38,39]. A incorporação de vidro bioativo e outros componentes como zircônia contribui para sua resistência mecânica e biocompatibilidade, diferenciando esse cimento dos cimentos tradicionais à base de resina epóxi como o AH Plus original [38].

As propriedades físico-químicas do AHP-BIO são destacadas pela apresentação de baixa solubilidade, expansão controlada após presa, radiopacidade, capacidade de liberação de íons cálcio e indução a formação de tecido mineralizado, propriedades que são críticas para seu desempenho clínico [28]. Pesquisas recentes avaliaram o comportamento do cimento AHP-BIO. Em estudos *in vitro*, foi comprovado que esse cimento possui uma ação antimicrobiana moderada com capacidade de inibir o crescimento de algumas espécies bacterianas relacionadas à infecção persistente dos canais radiculares, como *Enterococcus faecalis* [28]. Além disso, sua biocompatibilidade foi comprovada em estudos que demonstraram que o AHP-BIO favorece a proliferação de células osteoblásticas e a formação de tecido mineralizado [40]. Entretanto, outros estudos indicam que o AHPB tem desempenho comparável aos cimentos tradicionais à base de resina em termos de dor pós-operatória [71]. O AHP-BIO representa um avanço significativo se comparado ao seu antecessor AH Plus. Porém, apesar dos benefícios apresentados, ainda há necessidade de mais estudos, incluindo estudos clínicos de longo prazo para corroborar com os dados obtidos nos estudos *in vitro*, sobretudo devido suas notórias diferenças de formulação.

1.2.8 Osteoclastogênese: Mecanismos e Relevância

A osteoclastogênese é o processo de formação de osteoclastos (células multinucleadas responsáveis pela reabsorção óssea) a partir de precursores de monócitos/macrófagos [72]. Este processo é fundamental para a remodelação óssea e reparação tecidual, principalmente no tratamento endodôntico, onde a saúde óssea é fundamental para o sucesso do tratamento e para a cicatrização dos tecidos periapicais [73]. O processo de osteoclastogênese é regulado principalmente pelo receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK) e seu ligante RANKL [74]. O RANKL é produzido por osteoblastos e osteócitos e se liga ao RANK na superfície dos

precursores dos osteoclastos, desencadeando uma série de eventos de sinalização que objetivam promover sua diferenciação em osteoclastos maduros [72]. Essa via de sinalização inclui diversos fatores de transcrição importantes, como o fator nuclear de células T ativadas 1 (NFATc1), considerado o regulador mestre da diferenciação osteoclástica [75]. Também é essencial a presença do fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), pois auxilia na proliferação e sobrevivência dos precursores de osteoclastos [76]. O equilíbrio entre o RANKL e seu receptor antagonista osteoprotegerina (OPG) é fundamental, pois um aumento na proporção de RANKL em relação ao OPG pode intensificar a osteoclastogênese, resultando em maior reabsorção óssea [74]. No contexto endodôntico, controlar esse equilíbrio é importante para evitar a perda óssea excessiva durante as respostas inflamatórias [74]. Durante a osteoclastogênese, as células precursoras mononucleares sofrem fusão celular para formar osteoclastos multinucleados, este processo de fusão é facilitado por proteínas como a proteína transmembrana específica de células dendríticas (DC-STAMP), que é crítica para o sucesso da formação de osteoclastos [77]. A regulação deste processo é complexa e pode ser afetada por uma variedade de citocinas e fatores ambientais, por exemplo, foi demonstrado em um estudo que a interleucina-3 (IL-3) promove o desenvolvimento de células progenitoras de osteoclastos enquanto inibe o processo osteoclastogênico, sugerindo um papel duplo na osteoclastogênese [78]. Na remodelação óssea e na reparação tecidual, os osteoclastos desempenham um papel fundamental ao reabsorver o osso danificado ou necrótico, criando assim um ambiente adequado para os osteoblastos depositarem nova matriz óssea [79]. Esta ação coordenada é essencial para manter a homeostase óssea e promover o processo de cicatrização após procedimentos odontológicos como extração dentária ou tratamento endodôntico [80]. O equilíbrio entre a atividade dos osteoclastos e dos osteoblastos é crítico, um desequilíbrio pode levar a condições patológicas levando à reabsorção óssea excessiva [80].

Na endodontia, a osteoclastogênese é frequentemente desencadeada por mediadores inflamatórios liberados em resposta a infecções, como aquelas provocadas por bactérias, como o *Enterococcus faecalis*, comumente associada a falhas endodônticas [73,81]. A presença de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1) e o TNF- α , pode estimular a diferenciação e atividade dos osteoclastos, promovendo a reabsorção óssea nas áreas periapicais [82]. Esse processo pode levar à formação de lesões periapicais, caracterizadas pela perda

óssea ao redor das raízes dentárias, o que pode comprometer o sucesso do tratamento [73,81]. A saúde dos tecidos da região periapical está intimamente ligada à atividade dos osteoclastos, por exemplo, citocinas inflamatórias presentes em lesões periapicais pode estimular a osteoclastogênese, levando à perda óssea ao redor das raízes dentárias [83]. Por outro lado, o tratamento endodôntico eficaz visa eliminar a infecção e inflamação, além de restaurar as funções normais dos osteoclastos e osteoblastos, que são essenciais para o sucesso da cicatrização e regeneração óssea [84]. A importância da osteoclastogênese abrange também as estratégias de tratamento em endodontia, um exemplo disso é o uso de hidróxido de cálcio na terapia endodôntica, que mostrou ser capaz de inibir a atividade osteoclástica, interrompendo a reabsorção radicular e favorecendo o reparo tecidual [85]. Assim, a osteoclastogênese desempenha um papel importante na endodontia, onde a formação e a atividade dos osteoclastos são reguladas de forma complexa por uma série de fatores, como citocinas e diferentes vias de sinalização. Portanto, compreender esses mecanismos é fundamental para desenvolver estratégias eficazes que promovam a regeneração e preservem a saúde óssea.

1.2.9 Interação entre Cimentos Biocerâmicos e Osteoclastogênese

A interação dos cimentos biocerâmicos com os osteoclastos é complexa, envolvendo tanto a inibição da osteoclastogênese quanto o estímulo à diferenciação osteogênica [86]. Um dos mecanismos pelos quais esses cimentos influenciam a atividade dos osteoclastos é a modulação do pH local [86]. Estudos mostram que os materiais biocerâmicos apresentam um comportamento alcalino, neutralizando o ácido láctico produzido pelos osteoclastos durante a reabsorção óssea [86]. Essa alcalinidade não só impede a dissolução dos componentes mineralizados, mas também ativa a fosfatase alcalina, uma enzima essencial para a mineralização [86]. A capacidade desses materiais de manter um pH elevado pode reduzir os danos causados pelos osteoclastos nos tecidos, criando um ambiente mais favorável à regeneração óssea [87].

Os cimentos biocerâmicos também demonstram a capacidade de inibir a formação e função dos osteoclastos sem apresentar citotoxicidade significativa [88]. Além disso, eles suprimem a expressão de genes relacionados aos osteoclastos e

modulam vias de sinalização envolvidas na osteoclastogênese [88]. Assim, a exposição prolongada a cimentos biocerâmicos tende a inibir a diferenciação e atividade osteoclástica [89]. Ademais, esses cimentos liberam íons, como estrôncio e cálcio, que têm efeitos inibitórios sobre a osteoclastogênese [90]. O estrôncio, em particular, promove a osteogênese ao mesmo tempo que suprime a atividade dos osteoclastos, o que resulta em melhores resultados na regeneração óssea, pois favorece tanto a proliferação quanto a diferenciação de osteoblastos, equilibrando a remodelação óssea [90]. Estudos *in vitro* mostram que os cimentos biocerâmicos influenciam a expressão de importantes marcadores osteoclastogênicos. Por exemplo, a presença desses materiais está associada à regulação negativa do NFATc1, um regulador chave na diferenciação dos osteoclastos, essencial para sua maturação [91,92]. Ao inibir essas vias, os cimentos biocerâmicos podem reduzir a reabsorção óssea, promovendo um equilíbrio mais adequado entre osteogênese e osteoclastogênese. Esses achados são confirmados por estudos *in vivo*, que mostram que os cimentos biocerâmicos não apenas melhoram o reparo ósseo, mas também incentivam a diferenciação osteogênica [92]. Materiais como o MTA e o Biodentine promovem a deposição de hidroxiapatita, um componente chave do osso, favorecendo a cicatrização de lesões periapicais [92]. O potencial regenerativo desses materiais se deve à sua capacidade de replicar a composição mineral natural do osso, proporcionando um ambiente favorável para a atividade dos osteoblastos e inibindo a reabsorção mediada pelos osteoclastos [93]. Contudo, uma resposta adaptativa das células pode ocorrer ao longo do tempo, com os osteoclastos aderindo e alterando as superfícies de biocerâmicos, como a hidroxiapatita e o fosfato tricálcico, o que pode modificar suas propriedades [89,94].

Esses dados indicam que os cimentos biocerâmicos podem favorecer a cicatrização óssea após o tratamento endodôntico, ao modularem a atividade tanto dos osteoblastos quanto dos osteoclastos. Assim, a interação dos cimentos biocerâmicos com os osteoclastos na endodontia envolve dois mecanismos principais: a regulação do pH local para inibir a atividade osteoclástica e a liberação de íons bioativos que promovem a osteogênese, tornando esses materiais uma ferramenta valiosa em tratamentos que visam a regeneração e o reparo ósseo em particular nos casos em que há perda óssea periapical significativa. Com relação ao cimento AHP-BIO, a sua biocompatibilidade e seu potencial de indução de mineralização já foram avaliados anteriormente em estudo com células osteoblásticas [95]. Porém, os efeitos

do AHP-BIO sobre células osteoclásticas e no processo de osteoclastogênese permanecem não explorados.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar as propriedades químicas e os efeitos biológicos do cimento AH Plus Biocerâmico na osteoclastogênese utilizando culturas de células pré-osteoclásticas da linha celular murina RAW 264.7.

1.3.2 Objetivos Específicos

1) Mensurar o pH promovido pelo cimento AH Plus Biocerâmico no meio externo.

2) Mensurar a liberação de íons de cálcio (Ca^{2+}) promovida pelo cimento AH Plus Biocerâmico no meio externo.

3) Avaliar a capacidade de indução da formação de nódulos mineralizados do cimento AH Plus Biocerâmico em células Saos-2.

4) Avaliar a liberação de partículas do cimento AH Plus Biocerâmico no meio externo.

5) Investigar a biocompatibilidade do cimento AH Plus Biocerâmico por meio do teste de atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais (MTT) em células RAW 264.7.

6) Avaliar a proliferação celular de células RAW 264.7 expostas ao cimento AH Plus Biocerâmico a partir do experimento de *wound healing*.

7) Avaliar a atividade da enzima fosfatase ácida nas células RAW 264.7 expostas ao cimento AH Plus Biocerâmico.

8) Avaliar a capacidade da diferenciação osteoclástica das células RAW 264.7

quando expostas ao cimento AH Plus Biocerâmico por meio do ensaio de *TRAP staining*.

9) Avaliar a capacidade do cimento AH Plus Biocerâmico em induzir a expressão de genes associados à osteoclastogênese nas células RAW 264.7.

10) Avaliar a expressão de proteínas associadas a via Wnt nas células RAW 264.7.

1.4 REFERÊNCIAS

- [1] Yu CY, Abbott P V. Pulp microenvironment and mechanisms of pain arising from the dental pulp: From an endodontic perspective. *Australian Endodontic Journal* 2018;44:82–98. <https://doi.org/10.1111/AEJ.12257>.
- [2] Iwasaki Y, Otsuka H, Yanagisawa N, Hisamitsu H, Manabe A, Nonaka N, et al. In situ proliferation and differentiation of macrophages in dental pulp. *Cell Tissue Res* 2011;346:99–109. <https://doi.org/10.1007/S00441-011-1231-5>.
- [3] Bai Z, Liu J, Bai H. The profile of cytokines against bacterial infection in dental pulp. *J Gene Med* 2024;26. <https://doi.org/10.1002/JGM.3707>.
- [4] Xie Z, Shen Z, Zhan P, Yang J, Huang Q, Huang S, et al. Functional Dental Pulp Regeneration: Basic Research and Clinical Translation. *Int J Mol Sci* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/IJMS22168991>.
- [5] Watanabe T, Kamio N, Okabe T, Hayama T, Fukai J, Watanabe A, et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor Promotes Inflammation in Human Dental Pulp. *J Hard Tissue Biol* 2020;29:9–16. <https://doi.org/10.2485/JHTB.29.9>.
- [6] Wang J, Qiao J, Ma L, Li X, Wei C, Tian X, et al. Identification of the characteristics of infiltrating immune cells in pulpitis and its potential molecular regulation mechanism by bioinformatics method. *BMC Oral Health* 2023;23. <https://doi.org/10.1186/S12903-023-03020-Z>.
- [7] Huang X, Li Z, Liu A, Liu X, Guo H, Wu M, et al. Microenvironment Influences Odontogenic Mesenchymal Stem Cells Mediated Dental Pulp Regeneration. *Front Physiol* 2021;12. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2021.656588>.
- [8] Kadowaki M, Yoshida S, Itoyama T, Tomokiyo A, Hamano S, Hasegawa D, et al. Involvement of M1/M2 Macrophage Polarization in Reparative Dentin Formation. *Life* 2022;12. <https://doi.org/10.3390/LIFE12111812>.
- [9] Liu Y, Zhang Z, Li W, Tian S. PECAM1 Combines With CXCR4 to Trigger Inflammatory Cell Infiltration and Pulpitis Progression Through Activating the NF-κB Signaling Pathway. *Front Cell Dev Biol* 2020;8. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.593653>.
- [10] Li A, Li Z, Chiu W, Xiong C, Chen Q, Chen J, et al. Efficient Treatment of Pulpitis via Transplantation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Pericytes Partially through LTBP1-Mediated T Cell Suppression. *Biomedicines* 2023;11. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES11123199>.
- [11] Tomson RME, Polycarpou N, Tomson PL. Contemporary obturation of the root canal system. *Br Dent J* 2014;216:315–22. <https://doi.org/10.1038/SJ.BDJ.2014.205>.

- [12] Sidaravicius B, Aleksejuniene J, Eriksen HM. Endodontic treatment and prevalence of apical periodontitis in an adult population of Vilnius, Lithuania. *Dental Traumatology* 1999;15:210–5. <https://doi.org/10.1111/J.1600-9657.1999.TB00776.X>.
- [13] Immich F, de Oliveira D, Ribeiro de Andrade JS, da Silva Barboza A, Cuevas-Suárez CE, da Silva AF, et al. Evaluation of Antimicrobial Properties, Cell Viability, and Metalloproteinase Activity of Bioceramic Endodontic Materials Used in Vital Pulp Therapy. *J Funct Biomater* 2024;15. <https://doi.org/10.3390/JFB15030070>.
- [14] Kirkevang LL, Ørstavik D, Hörsted-Bindslev P, Wenzel A. Periapical status and quality of root fillings and coronal restorations in a Danish population. *Int Endod J* 2000;33:509–15. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2591.2000.00381.X>.
- [15] Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:86–93. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(98\)90404-8](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(98)90404-8).
- [16] Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *J Endod* 1997;23:225–8. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(97\)80051-9](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(97)80051-9).
- [17] Siqueira JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001;34:1–10. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2591.2001.00396.X>.
- [18] López-García S, Sánchez-Bautista S, García-Bernal D, Lozano A, Forner L, Sanz JL, et al. Premixed calcium silicate-based ceramic sealers promote osteogenic/cementogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells: A microscopy study. *Microsc Res Tech* 2024. <https://doi.org/10.1002/JEMT.24545>.
- [19] Gaeta C, Marruganti C, Mignosa E, Malvicini G, Verniani G, Tonini R, et al. Comparison of physico-chemical properties of zinc oxide eugenol cement and a bioceramic sealer. *Australian Endodontic Journal* 2023;49:187–93. <https://doi.org/10.1111/aej.12715>.
- [20] Komabayashi T, Colmenar D, Cvach N, Bhat A, Primus C, Imai Y. Comprehensive review of current endodontic sealers. *Dent Mater J* 2020;39:703–20. <https://doi.org/10.4012/DMJ.2019-288>.
- [21] Mendes AT, da Silva PB, Só BB, Hashizume LN, Vivian RR, da Rosa RA, et al. Evaluation of Physicochemical Properties of New Calcium Silicate-Based Sealer. *Braz Dent J* 2018;29:536–40. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201802088>.
- [22] Rekha R, Kavitha R, Venkitachalam R, Prabath SV, Deepthy S, Krishnan V.

Comparison of the sealing ability of bioceramic sealer against epoxy resin based sealer: A systematic review & meta-analysis. *J Oral Biol Craniofac Res* 2023;13:28–35. <https://doi.org/10.1016/J.JOBCR.2022.10.006>.

- [23] Mahendra DA, Nindita Y, Wibowo GW, Fortuna G. Comparison of apical sealing ability between bioceramic and zinc oxide eugenol-based sealer during root canal treatment, in vitro. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia* 2022;7:95. <https://doi.org/10.22146/MAJKEDGIIND.62212>.
- [24] Kachari M. Bioceramic root canal sealers: A brief review. *International Journal of Applied Dental Sciences* 2023;9:418–9. <https://doi.org/10.22271/ORAL.2023.V9.I3F.1838>.
- [25] Huang G, Liu SY, Wu JL, Qiu D, Dong YM. A novel bioactive glass-based root canal sealer in endodontics. *J Dent Sci* 2022;17:217–24. <https://doi.org/10.1016/J.JDS.2021.04.018>.
- [26] Sanz JL, Rodríguez-Lozano FJ, Llena C, Sauro S, Forner L. Bioactivity of Bioceramic Materials Used in the Dentin-Pulp Complex Therapy: A Systematic Review. *Materials* 2019;12. <https://doi.org/10.3390/MA12071015>.
- [27] Ha JH, Kim HC, Kim YK, Kwon TY. An Evaluation of Wetting and Adhesion of Three Bioceramic Root Canal Sealers to Intraradicular Human Dentin. *Materials* 2018;11. <https://doi.org/10.3390/MA11081286>.
- [28] Zamparini F, Prati C, Taddei P, Spinelli A, Di Foggia M, Gandolfi MG. Chemical-Physical Properties and Bioactivity of New Premixed Calcium Silicate-Bioceramic Root Canal Sealers. *Int J Mol Sci* 2022;23. <https://doi.org/10.3390/IJMS232213914>.
- [29] Amaral CS dos S, Tomaz AFG, Campos IJ de O, Medeiros ER de, Paula JVF de, Costa EHP da, et al. Current concepts related to the use of bioceramic materials in Dentistry. *Research, Society and Development* 2020;9:e34191211277. <https://doi.org/10.33448/RSD-V9I12.11277>.
- [30] Brito ACF de, Silva CIAS e, Pinheiro AM, Melo ICF, Sampaio ABHRD de, Vasconcelos EMGM de, et al. Reendodontic retreatment with apical radicular perforation of tooth 11: academic scientific case report. *Kariri Science - CEEAPE Biology and Health Journal* 2023;1:1–5. <https://doi.org/10.29327/2256856.1.2-1>.
- [31] Wang Z. Bioceramic materials in endodontics. *Endod Topics* 2015;32:3–30. <https://doi.org/10.1111/ETP.12075>.
- [32] Haapasalo M, Parhar M, Huang X, Wei X, Lin JS, Shen Y. Clinical use of bioceramic materials. *Endod Topics* 2015;32:97–117. <https://doi.org/10.1111/ETP.12078>.
- [33] Cantanhêde GCM, da Silva Júnior JP, da Silva Cavalcante BM, de Almeida PPL, da Silva ALC, Pereira E de A, et al. Retreatment of endodontics using

hybrid instrumentation in a tooth with periapical pathology. *Arquivos Em Odontologia* 2023;59:173–83. <https://doi.org/10.35699/2178-1990.2023.45626>.

- [34] Li J, Deng C, Liang W, Kang F, Bai Y, Ma B, et al. Mn-containing bioceramics inhibit osteoclastogenesis and promote osteoporotic bone regeneration via scavenging ROS. *Bioact Mater* 2021;6:3839–50. <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2021.03.039>.
- [35] Bernhardt A, Schamel M, Gbureck U, Gelinsky M. Osteoclastic differentiation and resorption is modulated by bioactive metal ions Co²⁺, Cu²⁺ and Cr³⁺ incorporated into calcium phosphate bone cements. *PLoS One* 2017;12. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0182109>.
- [36] Nakamura M, Hentunen T, Vääräniemi J, Salonen J, Hori N, Yamashita K. Characterization of Human Osteoclasts on Different Bioceramics. *Key Eng Mater* 2015;631:363–6. <https://doi.org/10.4028/WWW.SCIENTIFIC.NET/KEM.631.363>.
- [37] Quaresma SAL, Alves dos Santos GN, Silva-Sousa AC, Camargo RV, Lopes-Olhê FC, Silva-Sousa YTC, et al. Physicochemical properties of calcium silicate cement based endodontic sealers. *J Mech Behav Biomed Mater* 2024;151. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2024.106400>.
- [38] Sanz JL, López-García S, Rodríguez-Lozano FJ, Melo M, Lozano A, Llena C, et al. Cytocompatibility and bioactive potential of AH Plus Bioceramic Sealer: An in vitro study. *Int Endod J* 2022;55:1066–80. <https://doi.org/10.1111/IEJ.13805>.
- [39] Hamdy TM, Galal MM, Ismail AG, Saber S. Physicochemical properties of AH plus bioceramic sealer, Bio-C Sealer, and ADseal root canal sealer. *Head & Face Medicine* 2024;20. <https://doi.org/10.1186/S13005-023-00403-Z>.
- [40] Sanz JL, López-García S, García-Bernal D, Rodríguez-Lozano FJ, Forner L, Lozano A, et al. Comparative bioactivity and immunomodulatory potential of the new Bioroot Flow and AH Plus Bioceramic sealer: An in vitro study on hPDLSCs. *Clin Oral Investig* 2024;28. <https://doi.org/10.1007/s00784-024-05593-7>.
- [41] Souza LC de, Neves GST, Kirkpatrick T, Letra A, Silva R. Physicochemical and Biological Properties of AH Plus Bioceramic. *J Endod* 2023;49:69–76. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2022.10.009>.
- [42] Donnermeyer D, Schemkämper P, Bürklein S, Schäfer E. Short and Long-Term Solubility, Alkalizing Effect, and Thermal Persistence of Premixed Calcium Silicate-Based Sealers: AH Plus Bioceramic Sealer vs. Total Fill BC Sealer. *Materials* 2022;15. <https://doi.org/10.3390/ma15207320>.
- [43] Parirokh M, Torabinejad M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview – part I: vital pulp therapy. *Int Endod J* 2018;51:177–205. <https://doi.org/10.1111/IEJ.12841>.

- [44] Zhang H, Pappen FG, Haapasalo M. Dentin Enhances the Antibacterial Effect of Mineral Trioxide Aggregate and Bioaggregate. *J Endod* 2009;35:221–4. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2008.11.001>.
- [45] Dawood AE, Parashos P, Wong RHK, Reynolds EC, Manton DJ. Calcium silicate-based cements: composition, properties, and clinical applications. *J Investig Clin Dent* 2017;8. <https://doi.org/10.1111/JICD.12195>.
- [46] Aljifan M, Almakrami A, Al Mutairi B, Alyami H, Hawsawi H, Halawi M, et al. Advantages and Types of Bioceramics in Endodontics. *Journal of Healthcare Sciences* 2022;02:73–8. <https://doi.org/10.52533/JOHS.2022.2502>.
- [47] Al-Haddad A, Aziz ZACA. Bioceramic-Based Root Canal Sealers: A Review. *Int J Biomater* 2016;2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9753210>.
- [48] Dong X, Xu X. Bioceramics in Endodontics: Updates and Future Perspectives. *Bioengineering* 2023;10. <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING10030354>.
- [49] Candeiro GTDM, Correia FC, Duarte MAH, Ribeiro-Siqueira DC, Gavini G. Evaluation of Radiopacity, pH, Release of Calcium Ions, and Flow of a Bioceramic Root Canal Sealer. *J Endod* 2012;38:842–5. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2012.02.029>.
- [50] Giraldi LC, Sant’anna Jr A. Main clinical considerations of bioceramic cement in endodontic treatment: a brief systematic review. *MedNEXT Journal of Medical and Health Sciences* 2022;3. <https://doi.org/10.54448/MDNT22309>.
- [51] Ashi T, Richert R, Mancino D, Jmal H, Alkhouri S, Addiego F, et al. Do the Mechanical Properties of Calcium-Silicate-Based Cements Influence the Stress Distribution of Different Retrograde Cavity Preparations? *Materials* 2023;16. <https://doi.org/10.3390/MA16083111>.
- [52] Hachem C El, Chedid JCA, Nehme W, Kaloustian MK, Ghosn N, Sahnouni H, et al. Physicochemical and Antibacterial Properties of Conventional and Two Premixed Root Canal Filling Materials in Primary Teeth. *J Funct Biomater* 2022;13. <https://doi.org/10.3390/JFB13040177>.
- [53] Zhang S, Yang X, Fan M. BioAggregate and iRoot BP Plus optimize the proliferation and mineralization ability of human dental pulp cells. *Int Endod J* 2013;46:923–9. <https://doi.org/10.1111/IEJ.12082>.
- [54] Xavier VFG, Moreira LFN, Xavier DG, Xavier JG, Steine W. Bioceramic Cements in Endodontics. *Oral Dis* 2020. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.89015>.
- [55] Loison-Robert LS, Tassin M, Bonte E, Berbar T, Isaac J, Berdal A, et al. In vitro effects of two silicate-based materials, Biodentine and BioRoot RCS, on dental pulp stem cells in models of reactionary and reparative dentinogenesis. *PLoS One* 2018;13. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0190014>.

- [56] Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Viapiana R, Berbert FLCV, Bernardi MIB, Tanomaru-Filho M. Calcium Silicate-Based Cements Associated with Micro- and Nanoparticle Radiopacifiers: Physicochemical Properties and Bioactivity. *Int Sch Res Notices* 2015;2015:1–7. <https://doi.org/10.1155/2015/874283>.
- [57] Portella FF, Collares FM, Dos Santos LA, Dos Santos BP, Camassola M, Leitune VCB, et al. Glycerol salicylate-based containing α -tricalcium phosphate as a bioactive root canal sealer. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2015;103:1663–9. <https://doi.org/10.1002/JBM.B.33326>.
- [58] Siboni F, Taddei P, Prati C, Gandolfi MG. Properties of NeoMTA Plus and MTA Plus cements for endodontics. *Int Endod J* 2017;50 Suppl 2:e83–94. <https://doi.org/10.1111/IEJ.12787>.
- [59] Siboni F, Taddei P, Zamparini F, Prati C, Gandolfi MG. Properties of BioRoot RCS, a tricalcium silicate endodontic sealer modified with povidone and polycarboxylate. *Int Endod J* 2017;50:e120–36. <https://doi.org/10.1111/IEJ.12856>.
- [60] Gandolfi MG, Taddei P, Siboni F, Modena E, Ginebra MP, Prati C. Fluoride-containing nanoporous calcium-silicate MTA cements for endodontics and oral surgery: early fluorapatite formation in a phosphate-containing solution. *Int Endod J* 2011;44:938–49. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2591.2011.01907.X>.
- [61] Singh G, Gupta I, Elshamy FMM, Boreak N, Homeida HE. In vitro comparison of antibacterial properties of bioceramic-based sealer, resin-based sealer and zinc oxide eugenol based sealer and two mineral trioxide aggregates. *Eur J Dent* 2016;10:366–9. <https://doi.org/10.4103/1305-7456.184145>.
- [62] Dioguardi M, Alovisi M, Sovereto D, Troiano G, Malagnino G, Di Cosola M, et al. Sealing ability and microbial leakage of root-end filling materials: MTA versus epoxy resin: A systematic review and meta-analysis. *Heliyon* 2021;7. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2021.E07494>.
- [63] Al-Nahlawi T, Ala Rachi M, Abu Hasna A. Endodontic Perforation Closure by Five Mineral Oxides Silicate-Based Cement with/without Collagen Sponge Matrix. *Int J Dent* 2021;2021. <https://doi.org/10.1155/2021/4683689>.
- [64] Jiménez-Sánchez M del C, Segura-Egea JJ, Díaz-Cuenca A. MTA HP Repair stimulates in vitro an homogeneous calcium phosphate phase coating deposition. *J Clin Exp Dent* 2019;11:e322–6. <https://doi.org/10.4317/JCED.55661>.
- [65] Candeiro GTM, Moura-Netto C, D’Almeida-Couto RS, Azambuja-Júnior N, Marques MM, Cai S, et al. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial effectiveness of a bioceramic endodontic sealer. *Int Endod J* 2016;49:858–64. <https://doi.org/10.1111/IEJ.12523>.
- [66] Shen Y, Peng B, Yang Y, Ma J, Haapasalo M. What do different tests tell about

the mechanical and biological properties of bioceramic materials? *Endod Topics* 2015;32:47–85. <https://doi.org/10.1111/ETP.12076>.

- [67] Romeed SA, Dunne SM. Stress analysis of different post-luting systems: a three-dimensional finite element analysis. *Aust Dent J* 2013;58:82–8. <https://doi.org/10.1111/ADJ.12030>.
- [68] Zamparini F, Prati C, Taddei P, Spinelli A, Di Foggia M, Gandolfi MG. Chemical-Physical Properties and Bioactivity of New Premixed Calcium Silicate-Bioceramic Root Canal Sealers. *Int J Mol Sci* 2022;23. <https://doi.org/10.3390/ijms232213914>.
- [69] Sanz JL, López-García S, Rodríguez-Lozano FJ, Melo M, Lozano A, Llena C, et al. Cytocompatibility and bioactive potential of AH Plus Bioceramic Sealer: An in vitro study. *Int Endod J* 2022;55:1066–80. <https://doi.org/10.1111/iej.13805>.
- [70] Hamdy TM, Galal MM, Ismail AG, Saber S. Physicochemical properties of AH plus bioceramic sealer, Bio-C Sealer, and ADseal root canal sealer. *Head Face Med* 2024;20. <https://doi.org/10.1186/s13005-023-00403-z>.
- [71] Shieh K, Yang J, Zhu EH, Peters OA, Hosseinpour S. Dentinal Tubule Penetrability and Bond Strength of Two Novel Calcium Silicate-Based Root Canal Sealers. *Materials* 2023;16. <https://doi.org/10.3390/MA16093309>.
- [72] James DE, Nestor BJ, Sculco TP, Ivashkiv LB, Ross FP, Goldring SR, et al. The Relative Timing of Exposure to Phagocytosable Particulates and to Osteoclastogenic Cytokines Is Critically Important in the Determination of Myeloid Cell Fate. *The Journal of Immunology* 2010;185:1265–73. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0902808>.
- [73] Pribadi N, Rahmawati R, Rukmo M, Tandadjaja AK, Kurniawan HJ, Hadi RP. The expression of nuclear factor of activated T cell c1 and receptor activator of nuclear factor kappa β induced by *Enterococcus faecalis* in osteoclastogenesis (laboratory experiment on Wistar rats). *Dent J* 2019;52:172–6. <https://doi.org/10.20473/J.DJMKG.V52.I4.P172-176>.
- [74] Lee DW, Kwon JY, Kim HK, Lee HJ, Kim ES, Kim HJ, et al. Propofol attenuates osteoclastogenesis by lowering RANKL/OPG ratio in mouse osteoblasts. *Int J Med Sci* 2018;15:723–9. <https://doi.org/10.7150/IJMS.22713>.
- [75] Maruyama T, Fukushima H, Nakao K, Shin M, Yasuda H, Weih F, et al. Processing of the NF- κ B2 precursor p100 to p52 is critical for RANKL-induced osteoclast differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research* 2010;25:1058–67. <https://doi.org/10.1359/JBMR.091032>.
- [76] Kim HJ, Kim BK, Ohk B, Yoon HJ, Kang WY, Cho S, et al. Estrogen-related receptor γ negatively regulates osteoclastogenesis and protects against inflammatory bone loss. *J Cell Physiol* 2019;234:1659–70. <https://doi.org/10.1002/JCP.27035>.

- [77] Takahashi A, Kukita A, Li YJ, Zhang JQ, Nomiyama H, Yamaza T, et al. Tunneling nanotube formation is essential for the regulation of osteoclastogenesis. *J Cell Biochem* 2013;114:1238–47. <https://doi.org/10.1002/JCB.24433>.
- [78] Hong H, Shi Z, Qiao P, Li H, McCoy EM, Mao P, et al. Interleukin-3 plays dual roles in osteoclastogenesis by promoting the development of osteoclast progenitors but inhibiting the osteoclastogenic process. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;440:545–50. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2013.09.098>.
- [79] Ko EA, Park YJ, Yoon DS, Lee KM, Kim J, Jung S, et al. Drug repositioning of polaprezinc for bone fracture healing. *Commun Biol* 2022;5. <https://doi.org/10.1038/S42003-022-03424-7>.
- [80] Panahipour L, Kargarpour Z, Laggner M, Mildner M, Ankersmit HJ, Gruber R. TGF- β in the Secretome of Irradiated Peripheral Blood Mononuclear Cells Supports In Vitro Osteoclastogenesis. *Int J Mol Sci* 2020;21:1–11. <https://doi.org/10.3390/IJMS21228569>.
- [81] Gao B, Chen W, Hao L, Zhu G, Feng S, Ci H, et al. Inhibiting Periapical Lesions through AAV-RNAi Silencing of Cathepsin K. *J Dent Res* 2013;92:180–6. <https://doi.org/10.1177/0022034512468757>.
- [82] Shadmehr E, Khademi A. Effect of Simvastatin on kinetics of Osteoprotegerin/receptor activator nuclear kappa B Ligand mRNA expression in periapical lesions. *Int Endod J* 2013;46:1077–82. <https://doi.org/10.1111/IEJ.12101>.
- [83] Yamashita J, Koi K, Yang DY, McCauley LK. Effect of Zoledronate on Oral Wound Healing in Rats. *Clinical Cancer Research* 2011;17:1405–14. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1614>.
- [84] Vieira AE, Repeke CE, De Barros Ferreira S, Colavite PM, Biguetti CC, Oliveira RC, et al. Intramembranous Bone Healing Process Subsequent to Tooth Extraction in Mice: Micro-Computed Tomography, Histomorphometric and Molecular Characterization. *PLoS One* 2015;10. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0128021>.
- [85] Darmiani S. Management of traumatically intruded permanent tooth with 30-month follow-up: A case report. *Journal of Surgery and Trauma* 2020;45–9. <https://doi.org/10.32592/JSURGERY.2020.8.1.107>.
- [86] Poggio C, Dagna A, Ceci M, Meravini MV, Colombo M, Pietrocola G. Solubility and pH of bioceramic root canal sealers: A comparative study. *J Clin Exp Dent* 2017;9:e1189–94. <https://doi.org/10.4317/JCED.54040>.
- [87] Dawood AE, Parashos P, Wong RHK, Reynolds EC, Manton DJ. Calcium silicate-based cements: composition, properties, and clinical applications. *J Investig Clin Dent* 2017;8. <https://doi.org/10.1111/JICD.12195>.

- [88] Zhang J, Zhu L, Yan P, Peng B. Effect of BioAggregate on Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B Ligand-induced Osteoclastogenesis from Murine Macrophage Cell Line In Vitro. *J Endod* 2015;41:1265–71. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2015.03.021>.
- [89] Rodrigues C, Costa-Rodrigues J, Capelas JA, Fernandes MH. Long-term dose- and time-dependent effects of endodontic sealers in human in vitro osteoclastogenesis. *J Endod* 2013;39:833–8. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2012.11.001>.
- [90] Weng L, Boda SK, Teusink MJ, Shuler FD, Li X, Xie J. Binary Doping of Strontium and Copper Enhancing Osteogenesis and Angiogenesis of Bioactive Glass Nanofibers while Suppressing Osteoclast Activity. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2017;9:24484–96. <https://doi.org/10.1021/ACSAMI.7B06521>.
- [91] Xia L, Yin Z, Mao L, Wang X, Liu J, Jiang X, et al. Akermanite bioceramics promote osteogenesis, angiogenesis and suppress osteoclastogenesis for osteoporotic bone regeneration. *Sci Rep* 2016;6. <https://doi.org/10.1038/SREP22005>.
- [92] Kim JY, Cheon YH, Yoon KH, Lee MS, Oh J. Parthenolide inhibits osteoclast differentiation and bone resorbing activity by down-regulation of NFATc1 induction and c-Fos stability, during RANKL-mediated osteoclastogenesis. *BMB Rep* 2014;47:451–6. <https://doi.org/10.5483/BMBREP.2014.47.8.206>.
- [93] Wannakajeebboon M, Sathorn C, Kornsutthisopon C, Santiwong B, Wasanapiarnpong T, Linsuwanont P. Evaluation of the chemical, physical, and biological properties of a newly developed bioceramic cement derived from cockle shells: an in vitro study. *BMC Oral Health* 2023;23. <https://doi.org/10.1186/S12903-023-03073-0>.
- [94] Benghuzzi H, Puckett A, Tucci M, Roberts B. Bioceramics surface modification by means of osteoclasts in culture. *Biomed Sci Instrum* 1999;35:321–6.
- [95] Chen JH, Raman V, Kuehne SA, Camilleri J, Hirschfeld J. Chemical, Antibacterial, and Cytotoxic Properties of Four Different Endodontic Sealer Leachates Over Time. *J Endod* 2024. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2024.08.015>.

CAPÍTULO 2

2. CAPÍTULO 2 – PROPRIEDADES QUÍMICAS DO CIMENTO AH PLUS BIOCERÂMICO

RESUMO

Introdução: O AH Plus Biocerâmico (AHP-BIO) é um cimento biocerâmico composto principalmente por dióxido de zircônia como radiopacificador e silicato tricálcico como componente bioativo. Diferente de outras formulações ele possui em sua composição baixa proporção de silicatos de cálcio, apresenta dimetilsulfóxido (DMSO) e traços de carbonato de lítio, alterações que podem impactar no seu efeito. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar as propriedades químicas do cimento AHP-BIO e o seu potencial de mineralização em culturas de células osteoblásticas humanas (Saos-2).

Métodos: amostras do cimento foram colocadas em moldes de polipropileno (3x5mm) e incubadas por 72 horas. Após o tempo de presa avaliou-se a concentração de cálcio com o medidor de cálcio portátil LAQUAtwin Ca-11, o pH foi determinado utilizando o equipamento Pen Type pH Meter – PH-009(I), os sólidos totais dissolvidos (TDS) foi determinado com o equipamento TDS Meter de alcance 0-9990ppm e o potencial de mineralização determinado através do ensaio de Coloração de nódulos de cálcio por vermelho de Alizarina (ARS). A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

Resultados: durante as horas iniciais de incubação o AHP-BIO apresentou declínio na liberação de cálcio, somente após 72 horas o AHP-BIO demonstrou maior liberação de cálcio que o grupo controle (CT). A mineralização com o ensaio ARS após 15 dias apresentou resultado maior para o grupo exposto de Saos-2 (~8,4) que o CT (~6,7). Durante todas as medidas o AHP-BIO apresentou níveis de pH mais elevados (~8,3) que o CT (~7,9). Os resultados de TDS mostraram um aumento significativo no total de sólidos dissolvidos a partir de 24 horas de exposição quando comparado ao CT.

Conclusão: O AHP-BIO apresenta propriedades químicas satisfatórias sendo capaz de induzir a mineralização como demonstrado pelo ensaio ARS e corroborado pelo resultado de liberação de íons de cálcio. Ademais, a sua liberação de íons de cálcio e pH alcalino estão associados à sua biocompatibilidade e bioatividade. O AHP-BIO não demonstrou toxicidade quanto a quantidade total de sólidos dissolvidos no meio possuindo potencial como material de primeira escolha para tratamentos endodônticos reparadores e regenerativos.

Palavras chaves: Endodontia; propriedades químicas; materiais de obturação de canal radicular; silicato de cálcio

ABSTRACT

Introduction: AH Plus Bioceramic (AHP-BIO) is a bioceramic sealer composed of zirconia dioxide as a radiopacifier and tricalcium silicate as a bioactive component. Unlike other formulations, it has a low proportion of calcium silicates and contains dimethyl sulfoxide (DMSO) and traces of lithium carbonate, changes that may impact its effect. Thus, the objective of the present study was to evaluate the chemical properties of AHP-BIO sealer and its mineralization potential in human osteoblastic cell cultures (Saos-2). **Methods:** sealer samples were placed in polypropylene molds (3x5mm) and incubated for 72 hours. After the setting time, the calcium concentration was evaluated with the portable calcium meter LAQUAtwin Ca-11, the pH was determined using the Pen Type pH Meter - PH-009(I) equipment and the total dissolved solids (TDS) were determined with the TDS Meter equipment with a range of 0-9990ppm and the mineralization potential determined through the Alizarin Red S Staining (ARS) assay. Statistical significance was set at $p < 0.05$. **Results:** During the initial hours of incubation, AHP-BIO showed a decline in calcium release; only after 72 hours did AHPB demonstrate greater calcium release than the control group (CT). Mineralization with the ARS test after 15 days showed a higher result for the group exposed to Saos-2 (~8.4) than CT (~6.7). During all measurements, AHP-BIO presented higher pH levels (~8.3) than CT (~7.9). TDS results showed a significant increase in total dissolved solids after 24 hours of exposure when compared to CT. **Conclusion:** AHP-BIO has satisfactory chemical properties and is capable of inducing mineralization, as demonstrated by the ARS assay and corroborated by the result of calcium ion release. Furthermore, its release of calcium ions and alkaline pH are associated with its biocompatibility and bioactivity. AHP-BIO did not demonstrate toxicity regarding the total amount of dissolved solids in the medium, having potential as a first-choice material for restorative and regenerative endodontic treatments.

Keywords: Endodontics; chemical properties; root canal filling materials; calcium silicate

2.1 INTRODUÇÃO

Os procedimentos de obturação na endodontia são essenciais para obtenção de selamento do sistema de canais radiculares a fim de prevenir a proliferação bacteriana [1]. Assim, o reparo de ápices abertos, perfurações radiculares e reabsorções radiculares demonstram um desafio, devido à dificuldade de realizar tal selamento e por demandar a formação de tecido mineralizado para completa reparação da região [2]. Uma das causas de insucesso mais comuns está relacionada a uma falha decorrente de um selamento inadequado do sistema de canais radiculares [3]. Assim, a escolha de um material adequado para obturação e um material adequado para reparo radicular contribui para o sucesso a longo prazo dos tratamentos endodônticos [4–6].

Uma das propriedades desejáveis dos cimentos endodônticos é a biocompatibilidade que, segundo a Organização Internacional de Padronização (ISO) 1942, refere-se em odontologia a um material que não cause efeitos adversos, locais ou sistêmicos, quando em contato à tecido vital promovendo a melhor resposta do hospedeiro [7]. As interações biológicas entre os cimentos endodônticos e o tecido perirradicular são importantes para assegurar a biocompatibilidade desses materiais [4]. As relações biológicas entre o cimento endodôntico e o tecido perirradicular podem ser classificadas em direta, quando o cimento entra em contato com esse tecido, e indireta, através da liberação de íons e produtos químicos do cimento [4,8,9]. Sendo que as propriedades e a composição do cimento endodôntico influenciam suas interações com o tecido perirradicular podendo gerar citotoxicidade, irritação do tecido e resposta inflamatória ou promover cura e regeneração tecidual, afetando assim o resultado do tratamento endodôntico [10,11].

Nesse contexto, os cimentos a base de silicato de cálcio (CSSs) ganharam relevância na comunidade científica devido sua maior biocompatibilidade e bioatividade [12,13]. Os CSSs são um subgrupo de materiais dentários que apresentam proporções variadas de cálcio e silicatos em sua composição e liberam hidróxido de cálcio como subproduto [14]. CSSs são materiais hidráulicos que tomam presa na presença de umidade, apresentam pH alcalino e liberam cálcio, levando a deposição de uma camada de apatita, o que pode explicar sua biocompatibilidade e bioatividade [15,16]. Devido a estas características, esses materiais exibem um efeito antibacteriano a longo prazo e promovem reparação do tecido perirradicular por meio

da formação de tecido mineralizado [7,17]. Os CSSs podem ser utilizados em uma grande gama de tratamentos endodônticos, sua biocompatibilidade, vantajosa atividade antibacteriana e propriedades físico-químicas fazem dos CSSs a principal escolha em alguns tratamentos endodônticos específicos [18]. Diferentes formas de CSSs foram introduzidas no mercado, apresentação como pó-líquido e produtos pré-misturados [7]. Recentemente, diversas marcas comerciais disponibilizaram CSSs pré-misturados devido sua facilidade de aplicação nos canais radiculares, que diferente de outras formulações, esses materiais prontos para uso não requerem mistura, atingindo presa na presença de umidade [8,19].

Um relativamente novo CSSs disponibilizado no mercado é o AH Plus Biocerâmico (AHP-BIO; Dentsply Sirona, Ballaigues, Switzerland). O AHP-BIO é um cimento biocerâmico pré-misturado composto principalmente por dióxido de zircônia (50-70%) como radiopacificador e silicato tricálcico (10-15%) como componente bioativo que foi desenvolvido para aprimorar os resultados clínicos com a combinação das propriedades bioativas de um biocerâmico com as vantagens de um cimento pré-misturado [19–21]. De acordo com informações do fabricante, o AHP-BIO apresenta capacidade de selamento superior; biocompatibilidade; atividade antimicrobiana; propriedades físicas excelentes; alta resistência a lavagem; e não descolore o dente [4,15,22]. Diferentemente de outros biocerâmicos disponíveis no mercado, o AHP-BIO possui uma baixa proporção de silicatos de cálcio em sua composição, não apresentando silicato dicálcico, e apresenta em sua formulação dimetilsulfóxido (DMSO) e traços de carbonato de lítio, o que não é conhecido de outros CSSs [22,23].

Apesar de os cimentos endodônticos serem desenvolvidos para permanecer dentro do sistema de canal radicular, por serem materiais fluidos eles podem ser forçados para o tecido perirradicular sem intenção através de canais acessórios e do forame apical [7,24,25]. Esses cimentos em contato com os fluidos dos tecidos podem dissolver levando à liberação de seus componentes no organismo [7]. Para assegurar a biocompatibilidade é importante utilizar materiais com mínimo efeito tóxico nos tecidos circundantes, assim, testes laboratoriais e estudos clínicos são importantes para avaliação dos CSSs e para assegurar o seu uso seguro na odontologia [4]. Variações na composição de um material pode levar a diferenças em suas características e nos resultados obtidos com o seu uso [12,26]. Assim, as marcantes diferenças em composição do AHP-BIO podem afetar positivamente ou negativamente os resultados obtidos com o seu uso. Tendo isso em vista o presente

estudo objetivou avaliar as propriedades químicas do AHP-BIO e o seu potencial de mineralização em culturas de células osteoblásticas humanas (Saos-2).

2.2 METODOLOGIA

Preparação do Biocerâmico

O cimento AHP-BIO foi preparado de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras do cimento foram colocadas em moldes de polipropileno (3x5mm) e incubadas por 72 horas a 37 °C, 95% de umidade e 5% de CO₂. Após a presa, as amostras foram acomodadas em dispositivos *transwell* com membranas permeáveis de 0,4 µm (Corning) para exposição de acordo com cada experimento.

Medição de íons de cálcio (Ca²⁺)

Após 72 horas de presa, as amostras foram incubadas em placas de 12 poços (Corning) contendo 1,5 mL de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) a 37 °C, 95% de umidade e 5% de CO₂. O grupo controle (CT) foi composto por 1,5 mL de DMEM. A concentração de cálcio foi determinada em partes por milhão (ppm) com o medidor de cálcio portátil LAQUAtwin Ca-11 (HORIBA, São Paulo, SP, Brasil). Coletamos 500 µL do meio e inserimos no equipamento para medição em 1, 3, 24, 72 e 96 horas. Cada medição e calibração do dispositivo seguiram as recomendações do fabricante. O experimento foi repetido três vezes de forma independente (n=9/grupo).

Coloração de nódulos de cálcio por vermelho de Alizarina (ARS)

Inicialmente células osteoblásticas humanas (Saos-2, ATCC HTB-85) foram cultivadas como monocamadas em frascos T-75 (Corning) contendo DMEM a 37 °C, 95% de umidade e 5% de CO₂. As células aderidas foram destacadas com tripsina/EDTA (0,25%) a 37 °C por 2 minutos. As células coletadas foram colocadas em placas de 12 poços (Corning) na densidade de 2x10⁴/poço e incubadas nas mesmas condições descritas por 24 horas antes da exposição ao material. Em seguida, amostras de AHPB foram acomodadas em dispositivos *transwell* com membranas permeáveis de 0,4 µm (Corning) para exposição a Saos-2 em meio osteogênico.

Após 15 dias de exposição, as monocamadas celulares foram lavadas três vezes com 1X PBS e fixadas em formaldeído a 10% (Sigma) à temperatura ambiente

durante 15 min. As monocamadas foram lavadas duas vezes com água destilada (dH₂O) e em seguida foi adicionado 1 mL de ARS 2% (pH 4,1) por poço (n=9/grupo). Incubamos as placas em temperatura ambiente por 20 min para coloração. Depois disso, os poços foram lavados cinco vezes com 2 mL de dH₂O. Os nódulos corados foram observados microscopicamente e fotografados (Zeiss Axiovert 100, Alemanha, Jena) com ampliação de 20x. Para quantificação do ARS foi adicionado 800 µL de ácido acético a 10% a cada poço de uma placa de 6 poços e incubado à temperatura ambiente durante 30 minutos com agitação, as células foram coletadas e transferidas em ácido acético a 10% para um tubo de micro centrífuga de 1,5 mL para vórtex por 30 segundos, as amostras foram aquecidas exatamente a 85 °C durante 10 minutos seguido por incubação em gelo durante 5 minutos, os tubos foram centrifugados a 20.000 g durante 15 minutos e 500 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo, foi adicionado 200 µL de hidróxido de amônio a 10% para neutralizar o ácido, foi feita alíquota de 150 µL por poço das amostras e padrão em triplicatas em uma placa de 96 poços (Corning) e a absorbância foi lida a 405 nm com um leitor de placas.

Medição do pH

O pH alcalino favorece o processo de reparo e é condição essencial para um cimento obturador. Para a determinação do pH foi utilizado o equipamento Pen Type pH Meter – PH-009(I)A (Mold & Bacteria Laboratories Store - Mississauga, Canada) nos intervalos de 1, 3, 24, 72 e 96 horas. Foram utilizadas as mesmas placas já preparadas para a medição de íons cálcio e os experimentos foram realizados de forma simultânea. O equipamento foi inserido em cada poço até que o sensor ficasse completamente submerso. Foram feitas 3 medidas em cada poço. Entre cada medição, o sensor foi limpo com água destilada e seco com papel absorvente.

Sólidos Totais Dissolvidos

Os sólidos totais dissolvidos (TDS) são geralmente compostos por sais inorgânicos (como cloreto, cálcio, magnésio, potássio, sódio, bicarbonatos e sulfatos) e matérias orgânicas dissolvidas, e seu excesso pode ser tóxico a muitas formas de vida [27]. Para sua mensuração, após 24h de presa, amostras dos cimentos foram colocadas separadamente em uma placa de 12 poços (Corning, Union City, CA, USA) contendo 2 mL de meio de cultura (DMEM) e mantidos em incubadora a 37 °C, 95% de umidade e 5% CO₂. O TDS em cada poço foi determinado com o equipamento

TDS Meter de alcance 0-9990ppm (Chihiros Aquatic Studio, Ningbo, Zhejiang, China) nos intervalos de 0h, 1h, 3h, 24h, 72h e 96h. Foram realizadas triplicatas de cada amostra e realizadas 3 medições em cada poço. O experimento foi repetido duas vezes de forma independente (n=18/grupo). Para mensuração, o sensor do equipamento foi introduzido em cada poço até que fosse notada a estabilização da medida. Após cada mensuração, o sensor foi limpo com 1 mL de água destilada e em seguida seco com papel absorvente e o resultado expresso em ppm.

Análise Estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para confirmar a normalidade na distribuição dos dados e o teste t de Student ($p < 0.05$) foi utilizado para comparação das amostras independentes com distribuição normal, nos casos de não normalidade foi realizado o teste U de Mann-Whitney. Todas as análises em cada experimento foram baseadas nos resultados de três testes independentes.

2.3 RESULTADOS

Liberção de cálcio

A liberação de íons de cálcio do grupo AHP-BIO foi significativamente menor que o grupo CT em 1 hora (83,33 ppm e 97,33 ppm) (FIG.01). Em 24 horas, ambos os grupos AHP-BIO e CT apresentaram quantidades semelhantes de liberação de íons de cálcio (97 ppm e 98,33 ppm), seguido por um aumento significativo no grupo AHP-BIO (174 ppm) em 72 horas comparado ao CT (92,58 ppm).

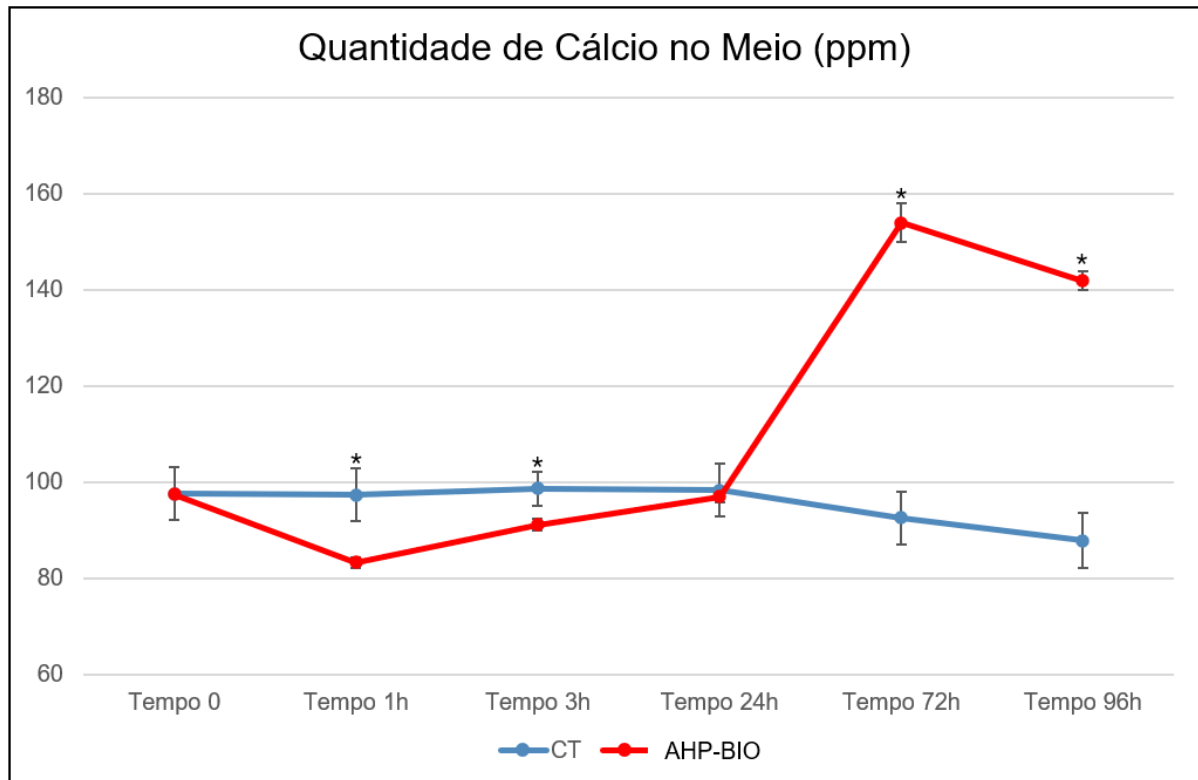


Figura 1: Concentrações de cálcio (Ca^{2+} , ppm) no meio de cultura (DMEM) após incubação do cimento por 0, 1, 3, 24, 72 e 96 horas. Os dados são apresentados como média \pm DP; Teste t-Student. * $p < 0.001$ AHP-BIO versus CT.

Ensaio de mineralização

O potencial de mineralização das células Saos-2 exposta ao AHP-BIO foi verificada utilizando o ensaio de coloração vermelha de alizarina (ARS) e comparado ao do grupo controle. Após 15 dias com as culturas celulares em meio osteogênico, as células Saos-2 apresentaram nódulos intensos de ARS em ambos os grupos, com aumento significativo no grupo AHP-BIO, com concentração de 8,48 mM de cálcio, quando comparado ao CT, concentração de 6,77 mM de cálcio (FIG.02).

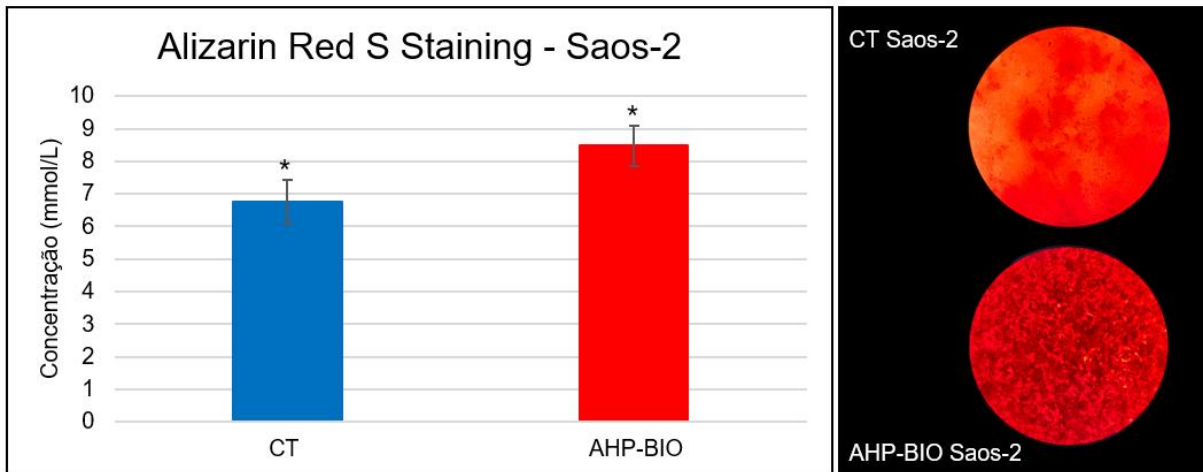


Figura 2: Resultado Alizarin Red S Staining para verificação da mineralização em culturas de Saos2 não expostas (CT) e expostas ao AH Plus Biocerâmico (AHP-BIO) como marcador tardio de diferenciação osteoblástica após 15 dias de exposição. Os dados são apresentados como média \pm DP; Teste t-Student. $*p < 0.001$ AHP-BIO versus CT.

Análise de pH

O pH do cimento testado foi alcalino em todos os tempos experimentais, atingindo o pico de pH em 3 h (8,33), seguido de decréscimo em 24h e novo pico em 72h (8,31), mantendo-se sempre mais alcalino que o grupo controle (FIG.03).

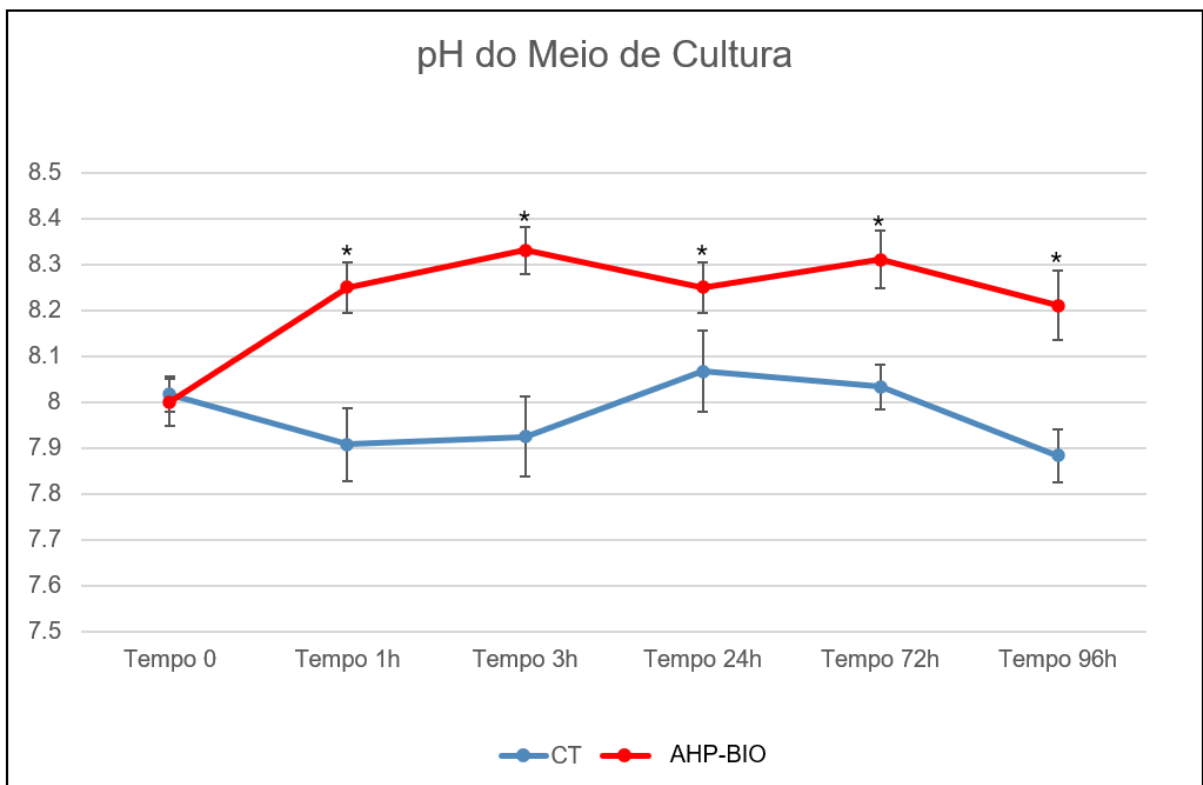


Figura 3: Mensuração do pH do meio de cultura (DMEM) após incubação do cimento por 0, 1, 3, 24, 72 e 96 horas. Os dados são apresentados como média \pm DP; Teste t-Student. $*p < 0.001$ AHP-BIO versus CT.

Sólidos Totais Dissolvidos (TDS)

O total de sólidos dissolvidos no meio do grupo AHP-BIO manteve-se semelhante ao do grupo CT até o tempo de 3 horas (~264 ppm), seguido de um acréscimo significativo do AHP-BIO (293 ppm) em 24h comparado ao CT (260,9 ppm) (FIG.04). Tal acréscimo manteve-se nos tempos experimentais de 72 e 92 horas.

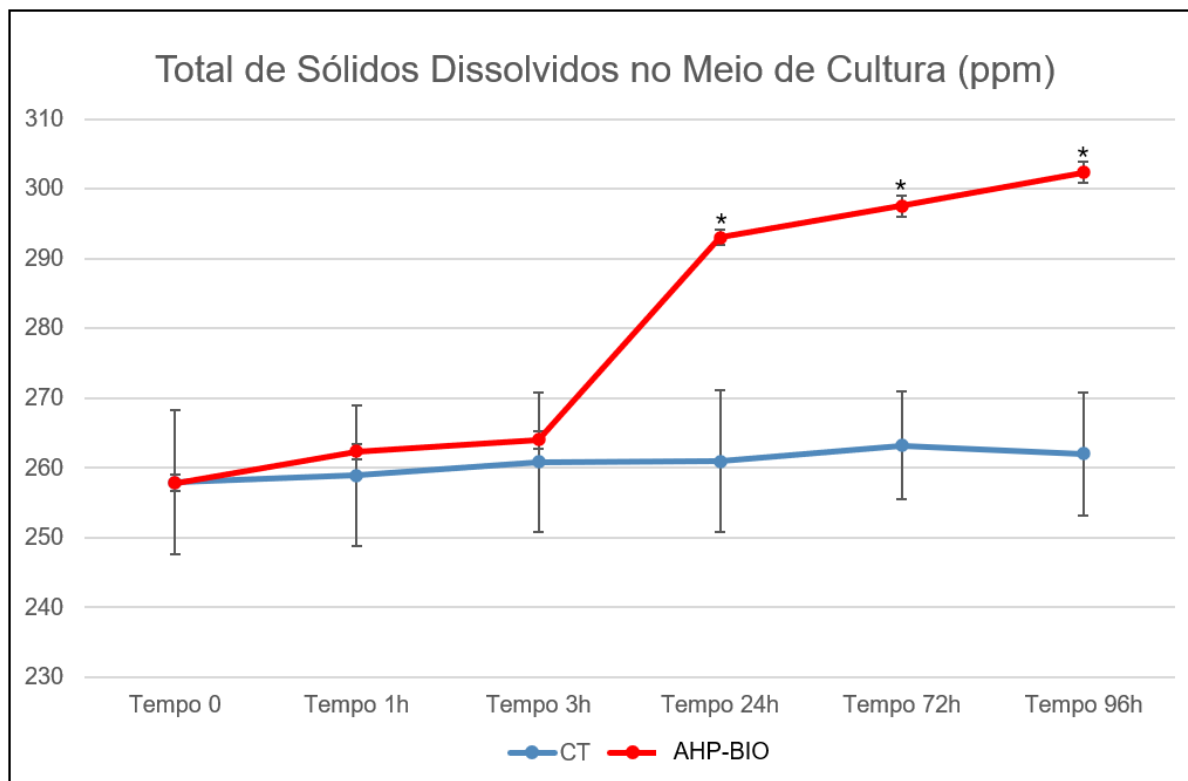


Figura 4: Mensuração de total de sólidos dissolvidos em meio de cultura (DMEM) após incubação do cimento por 0, 1, 3, 24 e 72 e 96 horas. Os dados são apresentados como média \pm DP; Teste t-Student. * $p < 0.001$ AHP-BIO versus CT.

2.4 DISCUSSÃO

As características químicas e biológicas de um cimento endodôntico estão associadas ao seu resultado clínico, assim, compreender essas propriedades é importante para escolha do material adequado [15,28]. Atualmente inúmeros materiais a base de silicato de cálcio estão à disposição no mercado [18,29]. Portanto, é importante avaliar as características dos materiais que surgem no mercado, que muitas vezes são liberados para comercialização com poucos estudos realizados, a fim de confirmar sua eficácia e ajudar o clínico na escolha do material mais adequado para os diferentes desafios clínicos da endodontia. O AHP-BIO é um novo cimento pré-misturado a base de silicato de cálcio que possui marcantes diferenças na sua

formulação, quando comparado a outros cimentos de mesma classificação [22,23]. Normalmente os CSSs apresentam uma alta porcentagem de silicatos de cálcio, diferente do AHP-BIO que apresenta apenas 5-15% de silicato de cálcio em sua composição [18,21]. Além disso, houve acréscimo de dimetilsulfóxido (DMSO) e de carbonato de lítio em sua formulação, também nunca vistos em outras formulações de CSSs [22,23]. A composição do material afeta diretamente o seu efeito [26] e por esses motivos o AHP-BIO pode ter efeitos divergentes dos materiais já consolidados no mercado. Esse estudo avaliou, *in vitro*, as propriedades químicas do AHP-BIO e seu potencial de mineralização em culturas de Saos-2.

A liberação de íons de cálcio pelo cimento endodôntico é de extrema importância pois está ligada ao aumento da sua bioatividade e biocompatibilidade [22,30]. O AHP-BIO apresentou aumento significativo na liberação de íons de cálcio a partir de 72 horas de incubação quando comparado ao CT, nossa hipótese é que ocorreu um sequestro inicial de cálcio do meio para posterior liberação. Zamparini et al, avaliou o potencial de liberação de cálcio do AHP-BIO, demonstrando alta liberação cumulativa, apesar da baixa quantidade de silicatos de cálcio em sua composição, corroborando com nossos resultados [19].

A liberação de íons de cálcio pelo cimento endodôntico melhora sua bioatividade e biocompatibilidade, demonstrando ser um fator importante na regeneração dos tecidos periapicais [15,31]. Estudos anteriores já comprovaram a biocompatibilidade do AHP-BIO com células do ligamento periodontal [4,8,12,15]. Além disso, os íons de cálcio são fortes sinais extracelulares para células associadas à mineralização, como os osteoblastos, demonstrando a importância de sua liberação como propriedade de materiais que precisam selar o espaço periapical principalmente em regiões com defeitos ósseos extensos [19,32].

A mineralização é extensamente estudada nos processos de reparação de tecidos como o osso, sendo também um indicativo da diferenciação osteoblástica [4]. Estudos anteriores já sugeriram o potencial dos CSSs de aumentar a atividade osteogênica, indicando ser componente ideal dos cimentos endodônticos seladores [4,33]. Nossos resultados demonstraram que o AHP-BIO foi capaz de induzir a mineralização de Saos-2, com um aumento dessa capacidade, mesmo estas células já sendo capazes de indução da mineralização em meio osteogênico. Isso coincide com estudos anteriores que demonstraram a capacidade de indução da mineralização do AHP-BIO utilizando o ensaio de coloração vermelha de alizarina (ARS) [4,12]. Além

de corroborar com os resultados obtidos na mensuração de íons de cálcio, onde a quantidade de liberação de íons de cálcio é compatível com a maior formação de nódulos mineralizados no grupo AHP-BIO no ensaio ARS.

O pH alcalino causado pelos cimentos endodônticos favorece o processo de reparo e é condição essencial para um cimento obturador, estando associado a biocompatibilidade e ao potencial osteogênico do cimento [34]. Nesse estudo, o AHP-BIO demonstrou pH alcalino em todos os tempos experimentais associada a uma pequena diminuição ao longo do tempo. O pH alcalino do AHP-BIO também foi demonstrado em estudos recentes [8,15,18]. O pH alcalino dos CSSs é considerado uma vantagem por levar à formação de depósitos semelhantes a apatita na superfície do cimento após o seu contato com a umidade proveniente do fluido corporal formando uma forte ligação química e aumentando a bioatividade [22,35]. A alcalinidade do cimento está associada a mineralização tecidual e indução da cicatrização apical [23,36]. Além de possuir efeitos bacteriostáticos significativos [37].

Sabe-se que as interações entre as células e o biomaterial podem levar à degeneração celular, retardando o processo de cicatrização, ou pode acelerar tal processo [4,38]. Ademais, os cimentos endodônticos devem ser biocompatíveis pois eles podem ficar em contato direto com os tecidos periradiculares ou indireto através da liberação de subprodutos [15]. Apesar de os cimentos endodônticos serem desenvolvidos para permanecer dentro do sistema de canal radicular, eles podem entrar em contato com o tecido perirradicular [7,24,25]. Esses cimentos em contato com os fluidos dos tecidos podem dissolver levando à liberação de seus componentes no organismo [7]. O teste de total de sólidos dissolvidos no meio é de suma importância pois o excesso de liberação desses compostos pode ser tóxico a muitas formas de vida [27].

A concentração segura de TDS em meios de cultura de células é considerado importante para manutenção da saúde e da funcionalidade celular [39]. Normalmente, o nível de TDS abaixo de 1000 mg/L, ou 1000 ppm, é considerado seguro para as células, pois concentrações que excedem tal limite podem acarretar ao estresse osmótico e à toxicidade, afetando de forma negativa a viabilidade celular e a atividade metabólica [39]. Tal limite está alinhado com as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS), que sugere níveis de TDS, na água potável por exemplo, de até 1000 mg/L para garantir a segurança e a qualidade [39]. Em aplicações de cultura celular, a composição do TDS é crucial, pois contém diversos íons, como

sódio, potássio, cálcio, magnésio e cloreto, que desempenham papéis fundamentais nos processos celulares [40]. E concentrações elevadas de determinados íons podem desestabilizar o equilíbrio osmótico, resultando em lise celular ou comprometimento funcional [40]. Nossos resultados demonstraram um aumento do TDS no grupo teste comparado ao grupo controle, porém, ambos estão abaixo do limite considerado seguro, sendo que o TDS máximo do grupo AHP-BIO foi cerca de 302 ppm. Assim, nesse contexto o AHPB pode ser considerado seguro.

O presente estudo foi realizado completamente *in vitro*, fato que pode ser considerada uma limitação, tendo em vista que as condições *in vitro* não refletem todas as condições observadas *in vivo*. Levando isso em consideração, de acordo com os nossos resultados o AHP-BIO possui propriedades químicas satisfatórias para um cimento biocerâmico associada ao potencial de indução da mineralização dos osteoblastos. Apresenta liberação de cálcio que está associada a biocompatibilidade e a bioatividade que é importante para a regeneração dos tecidos periapicais, possui pH alcalino que está associado ao potencial osteogênico e à atividade antimicrobiana do cimento, e possui TDS considerado seguro e não citotóxico para as células periapicais.

2.5 CONCLUSÃO

Neste estudo, o novo cimento AH Plus Biocerâmico apresentou propriedades químicas satisfatórias. Apresentando liberação de íons de cálcio e pH alcalino, ambos associados à biocompatibilidade e a bioatividade do cimento, além do potencial bacteriostático proveniente da alcalinidade do pH. De acordo com os resultados do ARS, o AHP-BIO é adequado para induzir a mineralização de osteoblastos da região periapical. Ademais não foi considerado tóxico quanto a quantidade total de sólidos dissolvidos no meio. De maneira geral, o cimento AH Plus Biocerâmico tem potencial como material de primeira escolha para tratamentos endodônticos reparadores e regenerativos.

2.6 REFERÊNCIAS

- [1] Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:86–93. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(98\)90404-8](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(98)90404-8).
- [2] Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *J Endod* 1997;23:225–8. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(97\)80051-9](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(97)80051-9).
- [3] Siqueira JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001;34:1–10. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2591.2001.00396.X>.
- [4] López-García S, Sánchez-Bautista S, García-Bernal D, Lozano A, Forner L, Sanz JL, et al. Premixed calcium silicate-based ceramic sealers promote osteogenic/cementogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells: A microscopy study. *Microsc Res Tech* 2024. <https://doi.org/10.1002/JEMT.24545>.
- [5] Gaeta C, Marruganti C, Mignosa E, Malvicini G, Verniani G, Tonini R, et al. Comparison of physico-chemical properties of zinc oxide eugenol cement and a bioceramic sealer. *Australian Endodontic Journal* 2023;49:187–93. <https://doi.org/10.1111/aej.12715>.
- [6] Komabayashi T, Colmenar D, Cvach N, Bhat A, Primus C, Imai Y. Comprehensive review of current endodontic sealers. *Dent Mater J* 2020;39:703–20. <https://doi.org/10.4012/DMJ.2019-288>.
- [7] Radwanski M, Rozpedek-Kaminska W, Galita G, Siwecka N, Sokolowski J, Majsterek I, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of bioceramic root canal sealers compared to conventional resin-based sealer. *Sci Rep* 2024;14. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54726-1>.
- [8] Kwak SW, Koo J, Song M, Jang IH, Gambarini G, Kim HC. Physicochemical Properties and Biocompatibility of Various Bioceramic Root Canal Sealers: In Vitro Study. *J Endod* 2023;49:871–9. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2023.05.013>.
- [9] Jung MK, Park SC, Kim YJ, Park JT, Knowles JC, Park JH, et al. Premixed Calcium Silicate-Based Root Canal Sealer Reinforced with Bioactive Glass Nanoparticles to Improve Biological Properties. *Pharmaceutics* 2022;14. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14091903>.
- [10] Santos JM, Pereira S, Sequeira DB, Messias AL, Martins JB, Cunha H, et al. Biocompatibility of a bioceramic silicone-based sealer in subcutaneous tissue. *J Oral Sci* 2019;61:171–7. <https://doi.org/10.2334/JOSNUSD.18-0145>.

- [11] Aminoshariae A, Kulild JC. The impact of sealer extrusion on endodontic outcome: A systematic review with meta-analysis. *Aust Endod J* 2020;46:123–9. <https://doi.org/10.1111/AEJ.12370>.
- [12] Sanz JL, López-García S, García-Bernal D, Rodríguez-Lozano FJ, Forner L, Lozano A, et al. Comparative bioactivity and immunomodulatory potential of the new Bioroot Flow and AH Plus Bioceramic sealer: An in vitro study on hPDLSCs. *Clin Oral Investig* 2024;28. <https://doi.org/10.1007/s00784-024-05593-7>.
- [13] Santiago MC, Gomes-Cornélio AL, de Oliveira LA, Tanomaru-Filho M, Salles LP. Calcium silicate-based cements cause environmental stiffness and show diverse potential to induce osteogenesis in human osteoblastic cells. *Sci Rep* 2021;11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96353-0>.
- [14] Donnermeyer D, Bürklein S, Dammaschke T, Schäfer E. Endodontic sealers based on calcium silicates: a systematic review. *Odontology* 2019;107:421–36. <https://doi.org/10.1007/S10266-018-0400-3>.
- [15] Souza LC de, Neves GST, Kirkpatrick T, Letra A, Silva R. Physicochemical and Biological Properties of AH Plus Bioceramic. *J Endod* 2023;49:69–76. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2022.10.009>.
- [16] Primus CM, Tay FR, Niu L na. Bioactive tri/dicalcium silicate cements for treatment of pulpal and periapical tissues. *Acta Biomater* 2019;96:35–54. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2019.05.050>.
- [17] Chopra V, Davis G, Baysan A. Physico-Chemical Properties of Calcium-Silicate vs. Resin Based Sealers-A Systematic Review and Meta-Analysis of Laboratory-Based Studies. *Materials (Basel)* 2021;15. <https://doi.org/10.3390/MA15010229>.
- [18] Kharouf N, Sauro S, Eid A, Zghal J, Jmal H, Seck A, et al. Physicochemical and Mechanical Properties of Premixed Calcium Silicate and Resin Sealers. *J Funct Biomater* 2023;14. <https://doi.org/10.3390/jfb14010009>.
- [19] Zamparini F, Prati C, Taddei P, Spinelli A, Di Foggia M, Gandolfi MG. Chemical-Physical Properties and Bioactivity of New Premixed Calcium Silicate-Bioceramic Root Canal Sealers. *Int J Mol Sci* 2022;23. <https://doi.org/10.3390/ijms232213914>.
- [20] Sanz JL, López-García S, Rodríguez-Lozano FJ, Melo M, Lozano A, Llena C, et al. Cytocompatibility and bioactive potential of AH Plus Bioceramic Sealer: An in vitro study. *Int Endod J* 2022;55:1066–80. <https://doi.org/10.1111/iej.13805>.
- [21] Quaresma SAL, Alves dos Santos GN, Silva-Sousa AC, Camargo RV, Lopes-Olhê FC, Silva-Sousa YTC, et al. Physicochemical properties of calcium silicate cement based endodontic sealers. *J Mech Behav Biomed Mater* 2024;151. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2024.106400>.

- [22] Hamdy TM, Galal MM, Ismail AG, Saber S. Physicochemical properties of AH plus bioceramic sealer, Bio-C Sealer, and ADseal root canal sealer. *Head Face Med* 2024;20. <https://doi.org/10.1186/s13005-023-00403-z>.
- [23] Donnermeyer D, Schemkämper P, Bürklein S, Schäfer E. Short and Long-Term Solubility, Alkalizing Effect, and Thermal Persistence of Premixed Calcium Silicate-Based Sealers: AH Plus Bioceramic Sealer vs. Total Fill BC Sealer. *Materials* 2022;15. <https://doi.org/10.3390/ma15207320>.
- [24] Özdemir O, Kopac T. Cytotoxicity and biocompatibility of root canal sealers: A review on recent studies. *J Appl Biomater Funct Mater* 2022;20. <https://doi.org/10.1177/22808000221076325>.
- [25] Fonseca DA, Paula AB, Marto CM, Coelho A, Paulo S, Martinho JP, et al. Biocompatibility of Root Canal Sealers: A Systematic Review of In Vitro and In Vivo Studies. *Materials (Basel)* 2019;12:1–34. <https://doi.org/10.3390/MA12244113>.
- [26] Queiroz MB, Torres FFE, Rodrigues EM, Viola KS, Bosso-Martelo R, Chavez-Andrade GM, et al. Physicochemical, biological, and antibacterial evaluation of tricalcium silicate-based reparative cements with different radiopacifiers. *Dent Mater* 2021;37:311–20. <https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2020.11.014>.
- [27] Zhang C, Zhang W, Huang Y, Gao X. Analysing the correlations of long-term seasonal water quality parameters, suspended solids and total dissolved solids in a shallow reservoir with meteorological factors. *Environ Sci Pollut Res Int* 2017;24:6746–56. <https://doi.org/10.1007/S11356-017-8402-1>.
- [28] Mann A, Zeng Y, Kirkpatrick T, van der Hoeven R, Silva R, Letra A, et al. Evaluation of the Physicochemical and Biological Properties of EndoSequence BC Sealer HiFlow. *J Endod* 2022;48:123–31. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2021.10.001>.
- [29] Camilleri J, Atmeh A, Li X, Meschi N. Present status and future directions: Hydraulic materials for endodontic use. *Int Endod J* 2022;55 Suppl 3:710–77. <https://doi.org/10.1111/IEJ.13709>.
- [30] Saber S, Raafat S, Elashiry M, El-Banna A, Schäfer E. Effect of Different Sealers on the Cytocompatibility and Osteogenic Potential of Human Periodontal Ligament Stem Cells: An In Vitro Study. *J Clin Med* 2023;12. <https://doi.org/10.3390/JCM12062344>.
- [31] Siboni F, Taddei P, Prati C, Gandolfi MG. Properties of NeoMTA Plus and MTA Plus cements for endodontics. *Int Endod J* 2017;50 Suppl 2:e83–94. <https://doi.org/10.1111/IEJ.12787>.
- [32] Jung GY, Park YJ, Han JS. Effects of HA released calcium ion on osteoblast differentiation. *J Mater Sci Mater Med* 2010;21:1649–54. <https://doi.org/10.1007/S10856-010-4011-Y>.

- [33] Santos JM, Coelho CM, Sequeira DB, Marques JA, Pereira JF, Sousa V, et al. Subcutaneous Implantation Assessment of New Calcium-Silicate Based Sealer for Warm Obturation. *Biomedicines* 2021;9:1–13. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9010024>.
- [34] Lee JK, Kwak SW, Ha JH, Lee WC, Kim HC. Physicochemical Properties of Epoxy Resin-Based and Bioceramic-Based Root Canal Sealers. *Bioinorg Chem Appl* 2017;2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2582849>.
- [35] Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J* 2011;44:697–730. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2591.2011.01886.X>.
- [36] Zaki DY, Zaazou MH, Khallaf ME, Hamdy TM. In Vivo Comparative Evaluation of Periapical Healing in Response to a Calcium Silicate and Calcium Hydroxide Based Endodontic Sealers. *Open Access Maced J Med Sci* 2018;6:1475–9. <https://doi.org/10.3889/OAMJMS.2018.293>.
- [37] Padan E, Bibi E, Ito M, Krulwich TA. Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights. *Biochim Biophys Acta* 2005;1717:67–88. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2005.09.010>.
- [38] Nguyen LCH, Pham LNG, Van Pham K, Nguyen MD, Ngo LTQ. Cytocompatibility and cell migration evaluation of calcium silicate-based root canal sealer compared to epoxide-amine resin sealer in stem cells from human apical papilla: An in-vitro study. *Aust Endod J* 2023;49:554–62. <https://doi.org/10.1111/AEJ.12786>.
- [39] Yasin M, Ketema T, Bacha K. Physico-chemical and bacteriological quality of drinking water of different sources, Jimma zone, Southwest Ethiopia. *BMC Res Notes* 2015;8. <https://doi.org/10.1186/S13104-015-1376-5>.
- [40] Anuar NS, Baharudin Zamani Z, Mohamad AN, Aina Safiq A, Sabirullah NA. Microcontroller-based Fertigation Farming Automation System. *EDUCATUM Journal of Science, Mathematics and Technology* 2022;9:49–55. <https://doi.org/10.37134/EJSMT.VOL9.2.7.2022>.

CAPÍTULO 3

3. CAPÍTULO 3 – EFEITO DO CIMENTO AH PLUS BIOCERÂMICO NA OSTEOCLASTOGÊNESE: UM ESTUDO IN VITRO

RESUMO

Introdução: O AH Plus Biocerâmico (AHP-BIO) surgiu como uma melhoria do seu precursor, o cimento AH Plus, que era considerado um padrão ouro em Endodontia. O novo AHP-BIO apresenta em sua formulação baixa proporção de silicatos de cálcio e a presença de dimetilsulfóxido (DMSO) e traços de carbonato de lítio, alterações que podem impactar no seu efeito. Assim, o presente estudo objetivou investigar o efeito do AHP-BIO na osteoclastogênese. **Metodologia:** Utilizando a linhagem celular pré-osteoclastica RAW 264.7, foram realizados teste de viabilidade celular pelo ensaio de MTT, proliferação pelo ensaio de *Wound Healing* e diferenciação osteoclástica pelo ensaio de *TRAP Staining*. Além disso, verificou-se a expressão dos genes CTSK, MMP-9 e ACP5 e a expressão de proteínas associadas à via Wnt. Os experimentos foram realizados em triplicata e a significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$. **Resultados:** O AHP-BIO aumentou a expressão de CTSK, MMP-9 e ACP5, genes presentes no processo de reabsorção óssea. Observou-se também um aumento significativo no número de osteoclastos multinucleados no grupo AHP-BIO, sugerindo estímulo na diferenciação e atividade osteoclástica, o que foi confirmado pelo ensaio de *TRAP Staining* e fosfatase ácida. Ademais o AHP-BIO demonstrou inibição da via Wnt com baixa expressão das proteínas c-Myc e MMP-7. **Conclusão:** O AHP-BIO mostrou-se biocompatível com células RAW 264.7 e estimulou a expressão de genes associados à reabsorção óssea, indicando potencial para influenciar a atividade osteoclástica. Essa característica pode ter um efeito dual, favorecendo a remodelação óssea, mas também pode ser desfavorável em condições que requerem a inibição ou controle rigoroso da osteoclastogênese, como casos com lesões periapicais e reabsorções radiculares internas ou externas.

Palavras-chaves: Endodontia; teste de biocompatibilidade; obturação de canal radicular; osteoclastos; osteoclastogênese

ABSTRACT

Introduction: AH Plus Bioceramic (AHP-BIO) emerged as an improvement of its precursor, AH Plus cement, which was considered a gold standard in Endodontics. The new AHP-BIO has in its formulation a low proportion of calcium silicates and the presence of dimethyl sulfoxide (DMSO) and traces of lithium carbonate, changes that may impact its effect. Thus, the present study aimed to investigate the effect of AHP-BIO on osteoclastogenesis. **Methodology:** Using the pre-osteoclastic cell line RAW 264.7, cell viability tests were performed by the MTT assay, proliferation by the Wound Healing assay and osteoclastic differentiation by the TRAP Staining assay. In addition, the expression of the genes CTSK, MMP-9 and ACP5 and the expression of proteins associated with the Wnt pathway were verified. The experiments were performed in triplicate and statistical significance was established at $p < 0.05$. **Results:** AHP-BIO increased the expression of CTSK, MMP-9 and ACP5, genes involved in the bone resorption process. A significant increase in the number of multinucleated osteoclasts was also observed in the AHP-BIO group, suggesting stimulation of osteoclastic differentiation and activity, which was confirmed by the TRAP staining assay and acid phosphatase. Furthermore, AHP-BIO demonstrated inhibition of the Wnt pathway with low expression of c-Myc and MMP-7 proteins. **Conclusion:** AHP-BIO was biocompatible with RAW 264.7 cells and stimulated the expression of genes associated with bone resorption, indicating the potential to influence osteoclastic activity. This characteristic may have a dual effect, favoring bone remodeling, but it may also be unfavorable in conditions that require inhibition or strict control of osteoclastogenesis, such as cases with periapical lesions and internal or external root resorption.

Keywords: Endodontics; materials testing; root canal obturation; osteoclasts; osteoclastogenesis

3.1 INTRODUÇÃO

Além de propriedades de selamento adequadas, o material obturador de canais radiculares deve estimular ou induzir o reparo dos tecidos remanescentes nos sistemas de canais radiculares inacessíveis e na região periapical [1]. Nesse contexto, os cimentos obturadores de canais radiculares evoluíram em sua composição ao longo do tempo. Atualmente, os cimentos biocerâmicos emergiram como uma inovação significativa na estimulação à mineralização e osteogênese [2]. A literatura demonstra uma interação positiva dos materiais a base de silicato de cálcio com os tecidos circundantes, contribuindo para a reparação e regeneração óssea, que é de extrema importância especialmente no tratamento de casos com diagnóstico de necrose e lesão apical [3].

A busca incessante por aprimorar cada vez mais essa classe de material denominada biocerâmicos, culmina com diversas marcas de cimentos obturadores à base de silicato de cálcio, disponíveis no mercado. Um dos cimentos biocerâmicos introduzidos recentemente no mercado é o AH Plus Biocerâmico (AHP-BIO). O AH Plus que empresta seu nome ao novo cimento, é um cimento à base de resina époxi que inclui em sua formulação, tungstato de cálcio e óxido de zircônio. Esses componentes são responsáveis por conferir propriedades desejáveis do cimento, como boa adesão à dentina, baixa solubilidade e alta radiopacidade [4,5]. Contrastando com suas excelentes propriedades físico-químicas, estudos prévios verificaram que o AH Plus em sua formulação original não apresenta nenhum potencial bioativo [6,7]. Um estudo de Silva et al. verificou que o AH Plus exibe forte citotoxicidade logo após a mistura [8]. Jung et al. acrescentam que, após presa, o AH Plus não induziu mineralização ou resposta bioativa em osteoblastos humanos [9]. O que também é reforçado pelo estudo de López-García et al., que utilizou o AH Plus como controle para comparar com cimentos bioativos, destacando sua falta de potencial de mineralização em contraste com os materiais bioativos [10].

Assim, em busca de um cimento obturador com atividade osteogênica, foi desenvolvido o AHP-BIO com uma formulação bastante diferente do AH Plus [11]. O AHP-BIO é um cimento pré-misturado composto predominantemente por dióxido de zircônia (50-70%), que atua como radiopacificador, e apenas 10-15% de silicato tricálcico, que confere bioatividade [11–13] e não possui silicato dicálcico em sua composição [2]. Diferente de outros cimentos biocerâmicos disponíveis, o AHP-BIO

incorpora dimetilsulfóxido (DMSO) e traços de carbonato de lítio, componentes ausentes em outros cimentos biocerâmicos conhecidos [2,14]. Uma formulação bastante interessante, uma proposta inovadora que demanda investigação quanto às propriedades biológicas. Entretanto, a literatura até então se concentrou na avaliação das propriedades biológicas do cimento AHP-BIO, citocompatibilidade, diferenciação osteogênica em células osteoblásticas e fibroblastos do ligamento periodontal. Em estudos com células-tronco do ligamento periodontal humano (hPDLSCs), observou-se que o AHP-BIO promoveu alta viabilidade celular, com taxas superiores a 85%, além de estimular a diferenciação osteogênica por meio do aumento da expressão de marcadores específicos, como a fosfatase alcalina (ALP) e o fator de transcrição RUNX2 [15]. Em outro estudo, células osteoblásticas humanas (Saos-2) expostas ao cimento AHP-BIO apresentaram alta viabilidade, com taxas superiores a 90% em todos os tempos experimentais, exibindo sua biocompatibilidade favorável [16].

Apesar das boas propriedades biológicas apresentadas em células formadoras de matriz mineralizada, a remodelação óssea é um processo dinâmico e complexo que envolve a ação coordenada e essencial tanto de osteoblastos como osteoclastos. A função osteoclástica de reabsorção da matriz mineralizada permite a renovação contínua da arquitetura óssea criando espaço para a deposição de novo osso [17,18]. Ainda mais, os osteoclastos são capazes de liberar moléculas sinalizadoras e fatores que estimulam a diferenciação e atividade dos osteoblastos para o local de remodelação criando um ambiente favorável à regeneração óssea [19,20]. Ainda não há estudo publicado que avalie como o AH Plus Biocerâmico afeta a osteoclastogênese. Portanto, este estudo teve por objetivo avaliar em sistema de cultura de células RAW 264.7 o efeito do cimento AH Plus Biocerâmico na osteoclastogênese.

3.2 METODOLOGIA

Cultura RAW 264.7

As células RAW 264.7 (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA, EUA) foram cultivadas como uma cultura em monocamada em placas de Petri (Corning, Union City, CA, EUA) em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco, NY, EUA), com 10% de soro fetal bovino (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), penicilina 100-U/mL e estreptomicina 100 µg/mL. As células foram cultivadas

três vezes por semana a 37 °C, umidade de 95% e CO₂ a 5% com o meio de cultura renovado a cada 2 dias. Após atingir confluência, as células foram destacadas por ação de solução de tripsina EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich) e distribuídas em placas de 12 poços (Corning, Union City, CA, EUA) a uma densidade de 2x10⁴ por poço. Em seguida, as células foram incubadas nas mesmas condições descritas acima durante 24 horas, para se obter a formação da monocamada antes da exposição ao cimento para cada experimento. Para induzir a diferenciação de osteoclastos, as células foram suspensas em meio DMEM com 10% FBS, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL, com adição de RANKL 35 ng/mL (Peprotech, Rocky Hill, CT, EUA) [21]. A diferenciação de células RAW 264.7 foi acompanhada *in vitro* até a formação de osteoclastos com 3 ou mais núcleos para realização das coletas de amostras e demais experimentos. O dia em que foi adicionada a citocina RANKL foi considerado como dia 0.

Preparo do Cimento Biocerâmico

O cimento AHP-BIO foi preparado em condições estéreis de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras do cimento foram colocadas em moldes de polipropileno (3x5mm) e incubadas por 72 horas a 37 °C, 95% de umidade e 5% de CO₂. Após esse tempo de presa, as amostras foram acomodadas em dispositivos do tipo *transwell* com membranas permeáveis de 0,4 µm (Corning, Union City, CA, EUA) para exposição das células RAW 264.7 de acordo com cada experimento. As células não expostas às amostras do cimento formaram o grupo controle positivo (CT).

Ensaio MTT

Após exposição das células ao material por 24, 72 e 168 horas, o meio foi trocado para DMEM contendo 0,55 mg/mL de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (Sigma Chemicals, St Louis, MO, EUA) sem SFB e as placas de 12 poços (Corning, Union City, CA, EUA) foram incubadas durante quatro horas adicionais. Após esse tempo, os cristais de formazan foram solubilizados em 500µL de isopropanol acidificado (HCl:isopropanol, 0,04N) e 100µL das soluções da amostra foram transferidos para uma placa de 96 poços (Corning, Union City, CA, EUA). A densidade óptica (DO) foi medida em 570 nm (ELx800, Biotek Instruments, Winooski, VT) e o experimento foi realizado em triplicatas, repetido 3 vezes de forma independente (n=9/grupo). O ensaio de MTT é baseado no princípio de que células

vivas possuem atividade mitocondrial estável, assim, a porcentagem de células vivas é proporcional à atividade mitocondrial [22,23]. As taxas de viabilidade das células expostas às amostras do AHP-BIO e do grupo controle foram calculadas de acordo com a seguinte fórmula: taxa de viabilidade = (DO da amostra × 100)/DO do CT.

Wound Healing Assay

Ao longo do fundo de cada poço de cultura de células, aproximadamente 95% confluentes, foi preparada uma “ferida” de 500 µm de largura usando a ponta de uma pipeta P-10 estéril. Em seguida, o meio de cultura foi renovado e colocamos os transwells com amostras de AHP-BIO nas placas para exposição celular. A cada 24 horas até 120 horas, 30 campos foram fotografados por grupo (n=30/grupo) utilizando o microscópio Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). As imagens microscópicas foram digitalizadas e a porcentagem de área coberta pelas células foi calculada utilizando o software ImageJ 1.52K (National Institutes of Health, NIH, Bethesda, Maryland, EUA) conforme descrito por Jonkman et al. [24].

TRAP Staining

Células RAW 264.7 foram cultivadas durante quatro dias em meio DMEM contendo RANKL (35 ng/mL), até quando foram observadas células em fase de osteoclastogênese, fusionando e multinucleadas com 3 ou mais núcleos. O meio foi removido e as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X) três vezes. As monocamadas de células nos poços foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 15 min em temperatura ambiente e lavadas por 5 min (PBS 1X), agitando três vezes. Em seguida, foram corados com o kit TRAP de acordo com o protocolo do fabricante (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 90 min a 37 °C ao abrigo da luz. Células TRAP positivas foram visualizadas e fotografadas utilizando o microscópio Axio Observer Z1 com objetiva de 20X (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Vinte campos por grupo foram fotografados (contagem total, n=20 fotos por grupo) e as imagens digitalizadas no software ImageJ (NIH). A mesma configuração de equilíbrio de cores, brilho e contraste foi ajustada para cada imagem. As células contendo três ou mais núcleos foram consideradas osteoclastos. O número de células osteoclásticas positivas para TRAP foi contado (contagem total, n=300 células por grupo), bem como, a média do número de núcleos por células multinucleadas foi

calculado e registrado para cada grupo [21].

Avaliação da Atividade de Fosfatase Ácida

Após quatro dias de exposição ao cimento AHP-BIO em condições de diferenciação celular, a atividade de fosfatase ácida foi avaliada com o kit Fosfatase Ácida (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). Inicialmente, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS 1X) e imersas em 1 mL de SDS 0,5% (Dodecilsulfato de sódio, SDS, Sigma Chemicals, St Louis, MO) por 30 min em temperatura ambiente sem agitação. Em seguida, as amostras foram acidificadas com ácido acético para uma concentração final de 0,2% (V/V). Alíquotas de 50 µL de cada amostra (AHP-BIO e CT) foram adicionadas ao substrato e incubadas em banho-maria a 37°C por 30 minutos, seguindo as instruções do fabricante. O princípio do teste se dá pela ação da fosfatase ácida da amostra sobre o substrato de timolftaleína monofosfato, seguida da adição de álcali que inibe a ação enzimática e converte a timolftaleína liberada na sua forma azul, que é medida colorimetricamente a 590 nm (ELx800, Biotek Instruments). O cálculo de fosfatase ácida foi dado pela seguinte fórmula: $\frac{\text{Abs. do teste} - \text{Abs. do controle}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 3$ e o resultado foi expresso como U/L. Repetimos o experimento em triplicatas de forma independente (n=9/grupo).

PCR em tempo real (qPCR)

Após 96 horas de exposição ao AHP-BIO, em diferenciação por adição de RANKL 35 ng/mL, as células foram coletadas em TRIzol (Termo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). O mesmo procedimento foi realizado para o grupo controle (CT, células em diferenciação, não expostas ao cimento). O RNA total foi extraído de acordo com as instruções do fabricante do TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). A fração proteica foi reservada para o experimento de *western blotting*. De cada amostra, 2 µg de RNA foram transcritos reversamente em cDNA (QuantiTect Kit, Qiagen, Hilden, Alemanha) e usados como molde para PCR em tempo real (qPCR) para avaliar os marcadores de catepsina k (CTSK), matrix metaloproteinase 9 (MMP-9) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (ACP5). A beta actina (B-ACTIN) foi o gene de referência. As reações foram realizadas em um sistema Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Alemanha) e incluíram SYBR-Green PCR Master Mix 1X (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA), 100 ng de cDNA e 0,25 µM

de cada primer forward e reverse (Exxtend, Paulínia, SP, Brasil) em volume final de 25 µL. Condições do ciclo térmico: 95 °C por 5 min, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 5s e priming, síntese mais leitura de fluorescência a 60 °C por 15s [25]. O cálculo do fold de expressão seguiu o método $\Delta\Delta C_t$ ($\text{fold} = 2^{-(\Delta\Delta C_t \pm \text{stdv})}$) (n=6/grupo). O primer forward e o primer reverso de cada gene estão descritos na tabela 1 (TABELA01).

Tabela 1: Sequências de primers forward e reverse utilizados para qPCR

Gene	Nº de Referência	Forward Primer	Reverse Primer
CTSK	NM_007802	5-CTGAAGATGCTTTCCCATATGTGGG-3	5-GCAGGCGTTGTTCTTATTCCGAGC-3
MMP-9	BC046991	5-CGAGTGGACGCGACCGTAGTTGG-3	5-CAGGCTTAGAGCCACGACCATACAG-3
ACP5	BC029644	5-ACACAGTGATGCTGTGTGGCAACTC-3	5-CCAGAGGCTTCCACATATATGATGG-3
B-ACTIN	NM_007393	5-GAAGAGCTATGAGCTGCCTG-3	5-CACAGAGTACTTGCGCTCAG-3

Western blotting

Após indução da osteoclastogênese, as células RAW 264.7 do grupo AHP-BIO e CT foram coletadas em TRIzol (Termo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) para os experimentos de *qPCR* e *Western blotting*. A extração de proteínas foi realizada utilizando o protocolo do fabricante, que envolve a lise celular em TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), seguida da adição de etanol para separar a fase aquosa (RNA) da fase intermediária e orgânica (DNA e proteínas). As proteínas foram precipitadas da fase orgânica utilizando isopropanol, lavadas com etanol e redissolvidas em solução SDS 1%. Em seguida foi realizada a quantificação das proteínas utilizando o equipamento NanoDrop 2000c Spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Para isso, o equipamento foi calibrado com o tampão utilizado no preparo das amostras, seguido da aplicação de 1-2 µL de cada amostra no pedestal, com a leitura imediata da concentração de proteínas. Após cada leitura, o pedestal foi higienizado com papel de laboratório umedecido para evitar contaminações entre as amostras. Após quantificação, as amostras foram suspensas em tampão SDS-PAGE e aproximadamente 15 µg de proteínas totais de cada amostra foram aplicados a um gel de poliacrilamida a 10%. As proteínas foram separadas por eletroforese utilizando

o equipamento Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Em seguida, as proteínas separadas no gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare Technologies, Chicago, IL, EUA) utilizando o equipamento Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Após a transferência foi realizado o bloqueio da membrana com incubação em 25 mL de tampão de bloqueio por 1 hora e em seguida as membranas foram então incubadas a 4 °C durante a noite com os seguintes anticorpos primários: proto-oncogene myc (c-Myc – anticorpo monoclonal de coelho – NR: D84C12), matrix metaloproteinase-7 (MMP-7 – anticorpo monoclonal de coelho – NR: D4H5), e beta actina (B-ACTIN – anticorpo monoclonal de coelho – NR: 13E5) (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA). Após as membranas terem sido lavadas com solução salina tamponada com Tris contendo Tween 20 (1% v/v), eles foram incubados em temperatura ambiente por 1 h com um anticorpo secundário Anti-rabbit IgG de coelho marcado com peroxidase de raiz-forte (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA). Para detecção de proteínas a membrana foi incubada com 10 mL de SignalFire (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA) por 1 minuto, o excesso de solução foi removido as membranas foram envoltas por filme plástico. As membranas foram analisadas e as imagens digitalizadas usando o analisador de imagem ImageQuant LAS 4000 luminescent (GE Healthcare Technologies, Chicago, IL, EUA) [26].

Análise Estatística

Os dados obtidos foram exportados para planilhas Excel (Microsoft Office 365, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) e submetidos a análise estatística. Todas as condições experimentais foram realizadas em triplicatas independentes. Os dados foram expressos como média \pm desvio-padrão (DP). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para confirmar a normalidade na distribuição dos dados e o teste t de Student foi utilizado para comparação das amostras independentes do grupo AHP-BIO e CT, nos casos de não normalidade foi realizado o teste U de Mann-Whitney. O cálculo do tamanho da amostra foi estabelecido usando as médias e a variância dentro do grupo com base nos resultados de outro estudo [21], com força de 80% e alfa de 5%, considerando o teste t de *Student*. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando o mesmo teste, com $p < 0,05$ considerado significativo. O programa estatístico utilizado foi o Jamovi 2.5 (The Jamovi Project, Sydney, Australia).

3.3 RESULTADOS

Viabilidade Celular

As células RAW 264.7 expostas ao AHP-BIO apresentaram taxa de viabilidade celular significativamente mais baixa nas primeiras 24h (~75%) quando comparada ao grupo controle (~100%) (FIG.01). Nos tempos experimentais seguintes a taxa de viabilidade do grupo AHP-BIO foi similar as taxas de viabilidade celular do grupo controle ~97% e ~95% em 72h e 168h horas de exposição, respectivamente.

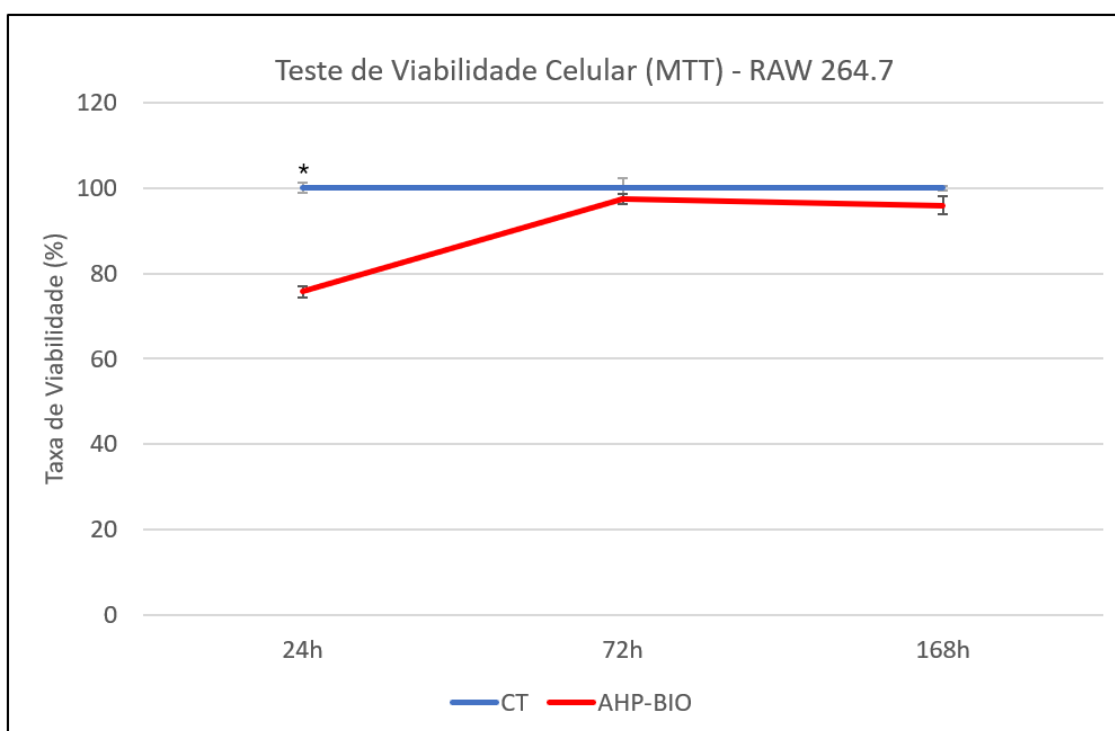


Figura 1: Gráfico de viabilidade celular de RAW 264.7. Células não expostas a nenhum material (CT) e expostas ao AH Plus Biocerâmico (AHP-BIO) nos tempos experimentais de 24h, 72h e 168h. Os dados são apresentados como média \pm DP; Teste t-Student. * $p < 0.001$, AHP-BIO versus CT.

Migração Celular

As células RAW 264.7 do grupo AHP-BIO apresentaram percentual de áreas de ferida com espaços abertos mais alto do que o grupo controle em todos os tempos experimentais, demonstrando menor percentual de área de migração coberta por células, com ausência de fechamento da área de ferida no tempo final de 120h (~47% de área fechada) comparado ao controle (~100% de área fechada) (FIG.02A). Apesar dos espaços das feridas não estarem completamente fechados no grupo AHP-BIO, as imagens microscópicas demonstraram células com morfologia padrão, arredondadas, similares as células RAW 264.7 do grupo controle (CT) (FIG.02B).

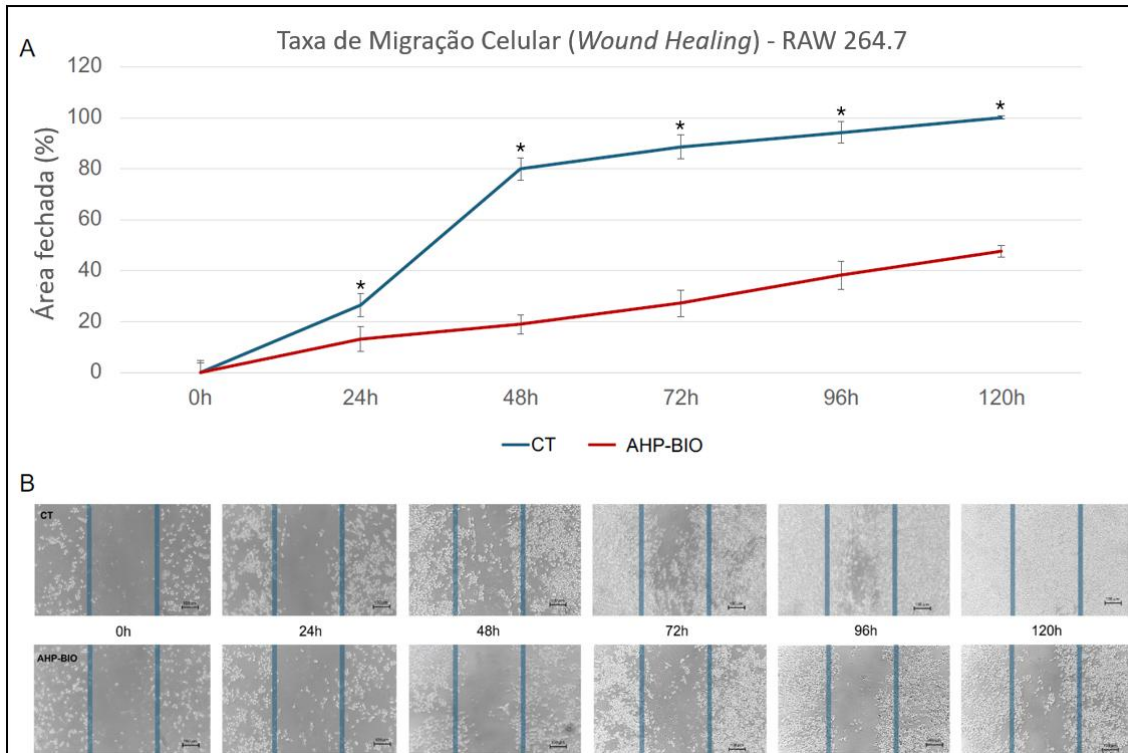


Figura 2: Gráfico percentual de área fechada (A) e imagens microscópicas representativas dos resultados de proliferação celular em cada tempo (B). Células RAW 264.7 não expostas (CT) e expostas ao AH Plus Biocerâmico (AHP-BIO). Os dados são apresentados como média \pm DP; teste t-Student. * $p < 0.001$ AHP-BIO versus CT.

Diferenciação de Osteoclastos

A presença de células osteoclásticas (Ocs) multinucleadas ativas foi confirmada pela coloração positiva com fosfatase ácida resistente a tartarato (TRAP), após estimuladas por RANKL. De maneira geral, o grupo CT apresentou campos mais ricos em células com a presença de células agregando quando comparado ao grupo AHP-BIO (FIG.03A). Apesar do grupo AHP-BIO ter apresentado campos com menor quantidade de células, foram observadas nos campos grande quantidade de células em fusão ou fusionadas com a presença de 3 ou mais núcleos. O grupo AHP-BIO apresentou média do número de osteoclastos significativamente maior do que o grupo CT, ~ 191.93 e ~ 136.5 , respectivamente (FIG.03B). A média de núcleos por células multinucleadas no grupo AHP-BIO ($\sim 5,54$) foi similar estatisticamente quando comparado ao grupo CT ($\sim 4,81$) (FIG.03C). Já a média da atividade de fosfatase ácida das células RAW 264.7 expostas ao AHP-BIO ($\sim 5,3$ U/L) foi estatisticamente maior que a do grupo CT ($\sim 4,5$ U/L) (FIG.03D).

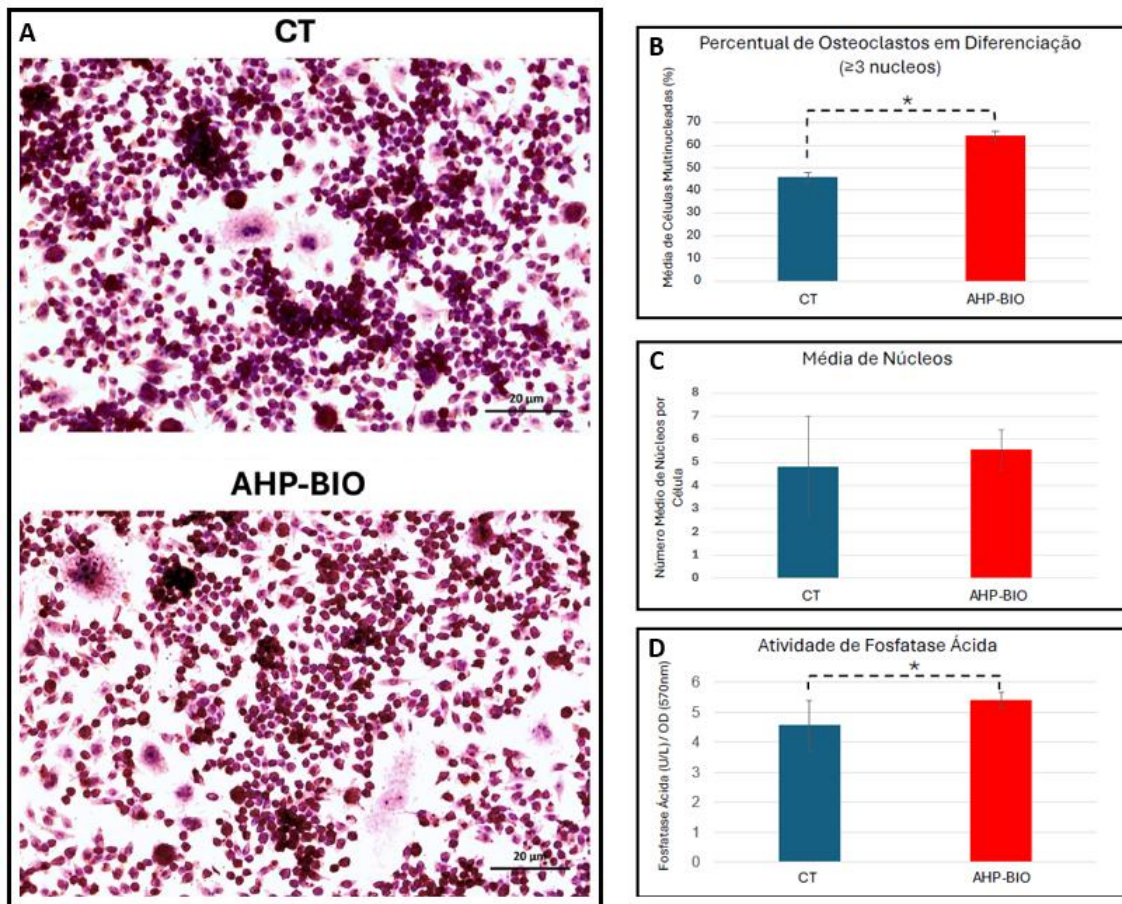


Figura 3: Diferenciação osteoclástica, células multinucleadas TRAP-positivas visualizadas por microscopia óptica, barra = 20µm (A). Células RAW 264.7 não expostas (CT) e expostas ao AH Plus Biocerâmico (AHP-BIO). Gráfico percentual médio de osteoclastos em diferenciação nos grupos CT e AHP-BIO (B). Gráfico da média de núcleos por osteoclasto nos grupos CT e AHP-BIO (C). Gráfico da média de atividade de fosfatase ácida nos grupos CT e AHP-BIO (D). Os dados são apresentados como média ± DP; Teste t-Student. *p<0.001, AHP-BIO versus CT.

Expressão de Genes da Osteoclastogênese

Após 96 h de exposição ao material e indução de diferenciação por RANKL, a alteração na expressão de catepsina k (CTSK) foi significativamente alta no grupo AHP-BIO ($6,92 \pm 3,54$; média e desvio padrão) comparada ao grupo CT ($1,09 \pm 0,44$) (FIG.04). O gene da matrix metaloproteinase 9 (MMP-9) demonstrou alta expressão no grupo AHP-BIO ($2,15 \pm 0,62$) em relação ao CT ($1,01 \pm 0,15$) (FIG.04). Assim como o gene da fosfatase ácida resistente ao tartarato (ACP5), que foi significativamente superexpresso no grupo AHP-BIO ($8,05 \pm 3,41$) em comparação ao grupo controle ($1,01 \pm 0,18$) (FIG.04).

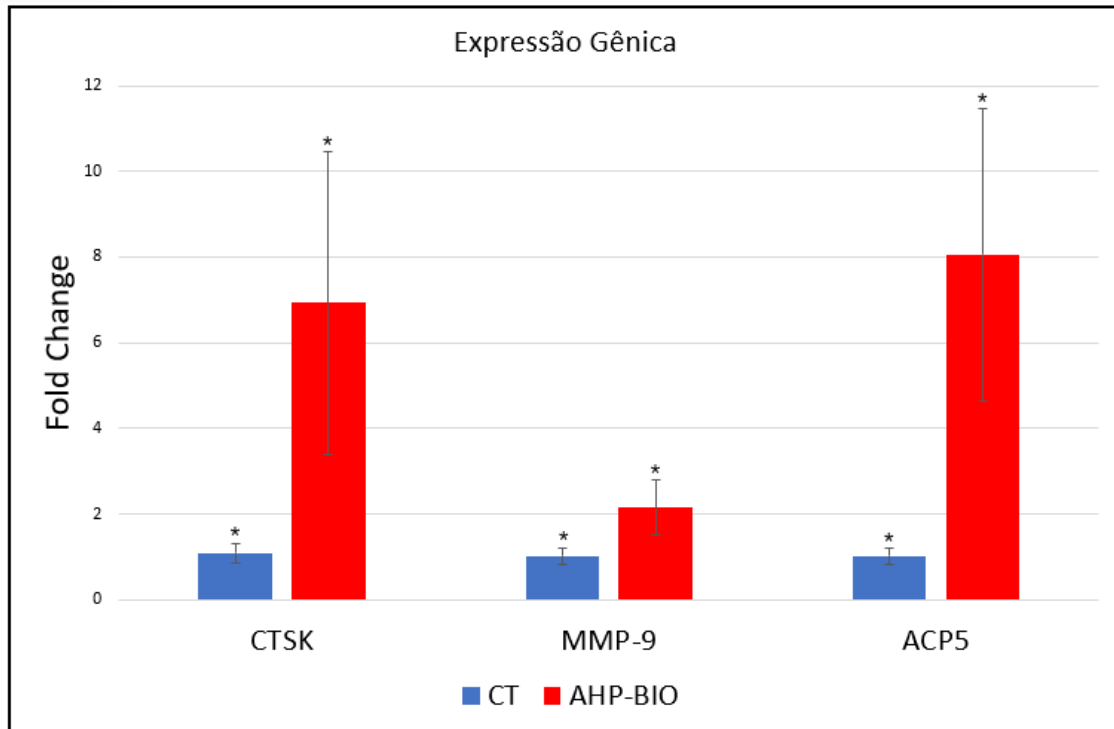


Figura 4: Gráfico do fold de expressão dos genes CTSK, MMP-9 e ACP5. Células RAW 264.7 não expostas (CT) e expostas ao AH Plus Biocerâmico (AHP-BIO). Os dados são apresentados como média \pm DP; Teste U de Mann-Whitney. * $p < 0.001$ AHP-BIO versus CT.

Proteínas da Via Wnt Canônica

Os níveis de expressão das proteínas proto-oncogene myc (c-Myc) e matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) foram medidos para avaliar a sinalização da via Wnt. No grupo AHP-BIO, os níveis de c-Myc e MMP-7 foram significativamente imperceptíveis em comparação ao grupo CT. A beta actina foi utilizada como controle (FIG.05).

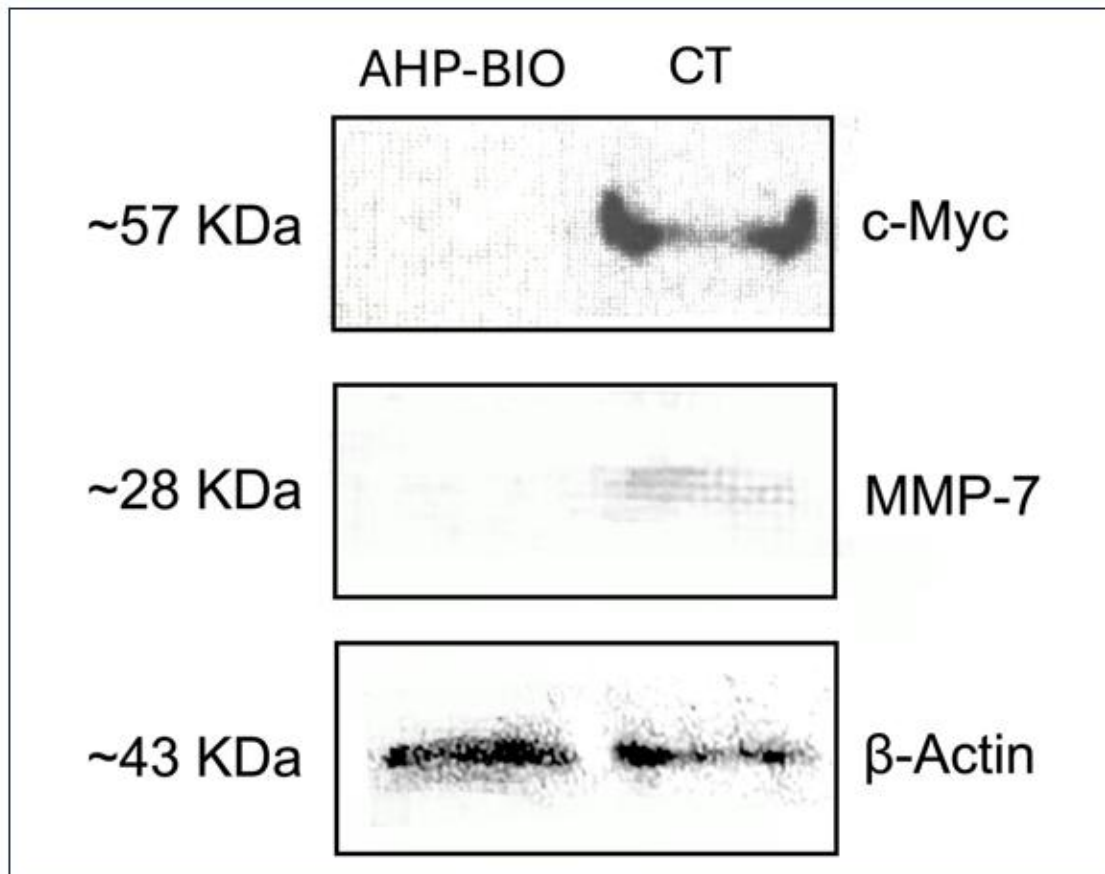


Figura 5: Imagens de Western blotting das proteínas c-Myc e MMP-7 em cultura de RAW 264.7 não expostas (CT) e expostas ao AH Plus Biocerâmico (AHP-BIO).

3.4 DISCUSSÃO

Neste estudo o cimento endodôntico AH Plus Biocerâmico, apresentou um efeito dual na osteoclastogênese em cultura de células do tipo RAW 264.7. Apesar do AHP-BIO inibir a proliferação celular, ao mesmo tempo o cimento estimulou a osteoclastogênese das células RAW em presença de RANKL. Os osteoclastos são células multinucleadas que possuem papel fundamental na remodelação óssea. A reabsorção da matriz mineralizada permite a renovação contínua da arquitetura óssea criando espaço para a deposição de novo osso [17]. Além disso, os osteoclastos expressam fatores de diferenciação e atividade osteoblástica [19]. A osteoclastogênese é um processo de diferenciação complexo que envolve a proliferação de pré-osteoclastos, migração, adesão e fusão célula-célula, levando à formação de osteoclastos multinucleados maduros que são responsáveis pela reabsorção óssea [27].

A taxa de viabilidade das células expostas ao AHP-BIO foi mais baixa nas

primeiras 24h (~75%) de exposição da RAW 264.7 ao AHP-BIO, entretanto a taxa de viabilidade se assemelhou a do grupo CT ao longo dos tempos do ensaio. Este padrão de taxa de viabilidade celular, associado aos resultados de *Wound Healing* indicam a possível inibição da fase de proliferação celular na osteoclastogênese induzida pelo cimento AHP-BIO. O fechamento de feridas no ensaio de *Wound Healing* engloba a avaliação da migração e proliferação celular, onde as interações entre as células e o biomaterial podem levar à degeneração celular ou indução de diferenciação, retardando o processo de fechamento do espaço da ferida ou acelerando tal processo [22,28]. As células expostas ao AHP-BIO demonstraram área da ferida aberta após 120h, porém sem afetar a viabilidade celular no resultado do MTT. Interessantemente, as imagens microscópicas do *Wound Healing* demonstraram aspecto morfológico de normalidade das células do grupo AHP-BIO. Segundo a norma ISO 10993, taxas de viabilidade abaixo de 70% com alterações da morfologia celular caracterizam citotoxicidade do material, dessa forma o AHP-BIO não deve ser considerado citotóxico para as células pré-osteoclasticas em nosso estudo [29]. A hipótese mais provável é de que o AHP-BIO potencializou o estímulo à diferenciação celular em osteoclastos, especialmente as fases de adesão e fusão célula-célula.

Os resultados da análise de microscopia óptica após coloração positiva com fosfatase ácida resistente a tartarato (TRAP) e mensuração da atividade da TRAP corroboraram a observação de que o AHP-BIO não inibiu a diferenciação osteoclástica. Ao contrário, o AHP-BIO estimulou a osteoclastogênese. O número de osteoclastos no grupo AHP-BIO foi significativamente maior quando comparado ao grupo controle. Alguns estudos que avaliaram os cimentos MTA e o Bioaggregate na osteoclastogênese demonstraram resultados diversos dos nossos, estes inibiram a osteoclastogênese [30,31]. O experimento de Cheng et al. com células RAW 264.7 expostas ao MTA e RANKL, revelou inibição da fusão dos precursores de osteoclastos sem causar citotoxicidade pelo ensaio de TRAP Staining. Além disso, houve redução da ativação da via de autofagia mediada por RANKL na presença do MTA como demonstrado pelo experimento de PCR em tempo real que demonstrou a regulação negativa dos genes Atg5-Atg12 e LC3-II que são componentes fundamentais do mecanismo autofágico e sua diminuição está associada ao potencial anti-osteoclastogênico do MTA, resultado oposto ao obtido em nosso estudo que demonstrou um aumento de genes relacionados à osteoclastogênese [31]. Em nosso estudo, a atividade de fosfatase ácida proporcionalmente a OD celular foi aumentada

na presença do AHP-BIO e significativamente maior à do grupo controle. Este resultado corroborou as análises microscópicas qualitativas das células coradas por TRAP. Tian et al. utilizaram uma série de ensaios para avaliar o efeito anti-osteoclastogênico do Bioaggregate também em células RAW 264.7 [30]. O Bioaggregate foi eficaz em reduzir a diferenciação de RAW 264.7 em osteoclastos pela diminuição do número de células TRAP-positivas [30]. Além disso, o Bioaggregate também inibiu a expressão de catepsina k uma protease essencial para a degradação da matriz óssea e marcador molecular de diferenciação de osteoclastos [30]. Diferente dos nossos resultados obtidos com o AHP-BIO, que além de apresentar o aumento do número de células TRAP-positivas, induziu uma expressão significativa do gene da catepsina k. A catepsina k é expressa durante os estágios tardios da diferenciação dos osteoclastos, cuja função é atuar na degradação de colágeno, permitindo a remoção subsequente de componentes minerais, contribuindo assim para a remodelação do tecido ósseo [32].

O AHP-BIO apresenta em sua composição dimetilsulfóxido (DMSO) e traços de carbonato de lítio, nossa hipótese é que a presença desses novos componentes podem estar associadas à indução da osteoclastogênese no AHP-BIO. Pois, quando comparamos com outros cimentos biocerâmicos, que não apresentam tais componentes em sua composição, estes apresentam um potencial anti-osteoclastogênico. Lemieux et al. demonstraram que concentrações de 5 μ M de DMSO resultaram em um aumento marcante na formação de osteoclastos, maior número de núcleos por célula e aumento da área de superfície celular em seu estudo, enquanto concentrações mais altas inibiram a diferenciação osteoclástica, demonstrando que o efeito do DMSO é dependente da concentração [33]. Assim, a presença de DMSO na formulação do AHP-BIO pode ter desempenhado um papel crucial na intensificação da osteoclastogênese observada, sugerindo que a adição de DMSO pode potencializar respostas biológicas específicas nos tecidos ósseos. Essa descoberta destaca a importância de considerar os componentes adicionais na formulação de cimentos odontológicos e suas implicações no comportamento celular. Entretanto, cabe ressaltar que o estudo de Lemieux et al. avaliou o DMSO sem adição de outros componentes, e a presença de outros componentes na formulação do AHP-BIO podem ter exibido influência no resultado obtido. Apesar da presença de lítio na composição do AHP-BIO, foi observado um efeito indutor da osteoclastogênese, em contraste com os achados relatados por Pan et al.. No referido artigo, materiais

biocerâmicos contendo lítio demonstraram um efeito inibitório na osteoclastogênese induzida por RANKL e na reabsorção óssea, atribuído à inibição da via de sinalização NF- κ B e à redução da expressão de genes essenciais para a atividade osteoclástica, como TRAP, catepsina K, c-Fos e NFATc1 [34]. Uma possível explicação para essa divergência pode estar relacionada na concentração de lítio presente no cimento AHP-BIO. Pan et al. observaram que o efeito inibitório era dose-dependente, com concentrações específicas (0,25-1 mg/mL) sendo eficazes para suprimir a diferenciação e a atividade dos osteoclastos, enquanto concentrações muito baixas ou excessivamente altas podem não produzir o mesmo efeito [34]. Portanto, é possível que a concentração de lítio no AHP-BIO tenha sido insuficiente para exercer um efeito inibitório ou que outros componentes do cimento possam ter modulado a resposta osteoclástica, superando a ação inibitória potencial do lítio. Esses achados ressaltam a complexidade da interação entre os componentes dos biomateriais e os mecanismos celulares, bem como a importância de avaliar cuidadosamente a concentração ideal de agentes bioativos, como o lítio, para otimizar seu desempenho clínico.

Entre os principais genes envolvidos na osteoclastogênese, além do gene da catepsina k, estão o ACP5 e MMP-9 como marcadores moleculares da diferenciação celular em osteoclastos [35,36]. A superexpressão de ACP5 no grupo AHP-BIO também está associada com uma ativação da função dos osteoclastos. O gene ACP5 é um marcador específico da osteoclastogênese que atua na degradação da matriz óssea sendo mais expresso durante as fases finais de diferenciação dessas células [35]. Tais resultados sugerem que o AHP-BIO pode estimular a expressão de genes fundamentais para a função osteoclástica. Além disso, houve maior expressão do gene MMP-9 no grupo AHP-BIO. O MMP-9, também denominada gelatinase B/colagenase tipo IV, está associado aos estágios iniciais da ativação de expressão genica em osteoclastos, sendo altamente expresso na indução da osteoclastogênese, além de apresentar atividade colagenolítica [36,37]. O resultado de expressão genica da MMP-9 no grupo AHP-BIO pode estar relacionado a maior indução à osteoclastogênese nesse grupo, levando os monócitos de camundongo de forma mais rápida à diferenciação, com maior número de células em fusão ou fusionadas, passando da fase pré-osteoclástica de proliferação celular.

Com o intuito de investigar a hipótese do cimento AHP-BIO ter causado um efeito inibitório sobre a sinalização da via Wnt canônica; acarretando diminuição da

proliferação e da migração celular sem afetar a diferenciação osteoclástica; nós avaliamos a expressão das proteínas c-Myc e MMP-7 por *western blotting*. As proteínas c-Myc e MMP-7 são marcadores *downstream* importantes dessa via de sinalização ativada [38]. De acordo com nossos resultados, foi possível observar que os níveis de expressão de c-Myc e MMP-7 estavam significativamente reduzidos no grupo AHP-BIO em comparação ao grupo CT, confirmando uma inibição da ativação da via Wnt canônica nesse grupo. A via de sinalização Wnt é uma das vias mais importantes no desenvolvimento e metabolismo ósseo, na diferenciação e proliferação de condrócitos, células-tronco mesenquimais, osteoclastos e osteoblastos [39]. A via Wnt canônica ativa exerce uma influência inibitória sobre a formação de osteoclastos, equilibrando o processo de remodelação óssea [38]. Um estudo de Weivoda et al., analisou a proteína Wnt3a que é uma das moléculas sinalizadoras mais importantes da via Wnt/ β -catenina, que regula a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência celular com função de ativação do processo de formação óssea [40]. Onde verificou-se que a Wnt3a, reduziu a formação de osteoclastos quando aplicada a culturas de diferenciação inicial de osteoclastos e de macrófagos da medula óssea, indicando que a Wnt3a suprime diretamente a diferenciação de osteoclastos por meio de vias canônicas (β -catenina) e não canônicas (cAMP/PKA), destacando a importância da via Wnt no processo de homeostasia óssea [40]. E segundo Liu et al., a ativação da via Wnt canônica leva ao acúmulo nuclear de β -catenina promovendo a transcrição de genes como c-Myc e MMP-7, que estão associados à proliferação celular e à remodelação tecidual [38]. Assim, a redução dos níveis de c-Myc e MMP-7 no grupo AHP-BIO indica que a via Wnt canônica está menos ativa, explicando o maior estímulo a diferenciação osteoclástica neste grupo.

Com base nos resultados obtidos, este estudo apresenta importantes avanços no entendimento dos efeitos do cimento AH Plus Biocerâmico na osteoclastogênese. A força deste estudo *in vitro* está na padronização dos ensaios, na avaliação da expressão de marcadores de osteoclastogênese, de genes específicos, das vias de sinalização afetadas pelo cimento endodôntico. Entretanto, limitações devem ser levadas em consideração, como a de que o modelo *in vitro* não reproduz de forma integral a complexidade do microambiente *in vivo*. Portanto, pesquisas futuras, incluindo estudos *in vivo*, são fundamentais para validar e ampliar os achados apresentados, contribuindo para a consolidação do conhecimento sobre o efeito do AHP-BIO na osteoclastogênese.

3.5 CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo que avaliou o efeito do AHP-BIO na osteoclastogênese. Os resultados demonstram que o cimento AH Plus Biocerâmico promove a osteoclastogênese, com aumento na expressão de genes de marcadores osteoclásticos, como a catepsina k, a fosfatase ácida e a matrix metalloproteinase, todos envolvidos na reabsorção óssea. Além disso, a redução da expressão das proteínas c-Myc e MMP-7 sugerem que o AHP-BIO tem ação inibitória da via Wnt canônica, como um dos mecanismos de ação do material em favor da osteoclastogênese. Do ponto de vista clínico, embora o AHP-BIO seja biocompatível, ele pode não ser ideal em situações clínicas que demonstrem osteoclastogênese exacerbada, como casos de reabsorções apicais, reabsorções radiculares que requerem uma inibição de osteoclastos. Entretanto, ele pode ser um cimento interessante em condições clínicas de atividade osteoblástica/osteoclastica equilibrada, estimulando a remodelação óssea com atuação de ambos os tipos celulares.

3.6 REFERÊNCIAS

- [1] Tomson RME, Polycarpou N, Tomson PL. Contemporary obturation of the root canal system. *Br Dent J* 2014;216:315–22. <https://doi.org/10.1038/SJ.BDJ.2014.205>.
- [2] Hamdy TM, Galal MM, Ismail AG, Saber S. Physicochemical properties of AH plus bioceramic sealer, Bio-C Sealer, and ADseal root canal sealer. *Head & Face Medicine* 2024;20. <https://doi.org/10.1186/S13005-023-00403-Z>.
- [3] Saber S, Raafat S, Elashiry M, El-Banna A, Schäfer E. Effect of Different Sealers on the Cytocompatibility and Osteogenic Potential of Human Periodontal Ligament Stem Cells: An In Vitro Study. *J Clin Med* 2023;12. <https://doi.org/10.3390/JCM12062344>.
- [4] Huang Y, Orhan K, Celikten B, Orhan AI, Tufenkci P, Sevimay S. Evaluation of the sealing ability of different root canal sealers: a combined SEM and micro-CT study. *Journal of Applied Oral Science* 2018;26. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2016-0584>.
- [5] Resende LM, Rached-Junior FJA, Versiani MA, Souza-Gabriel AE, Miranda CES, Silva-Sousa YTC, et al. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus, Epiphany, and Epiphany SE root canal sealers. *Int Endod J* 2009;42:785–93. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2591.2009.01584.X>.
- [6] Viapiana R, Guerreiro-Tanomaru JM, Hungaro-Duarte MA, Tanomaru-Filho M, Camilleri J. Chemical characterization and bioactivity of epoxy resin and Portland cement-based sealers with niobium and zirconium oxide radiopacifiers. *Dent Mater* 2014;30:1005–20. <https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2014.05.007>.
- [7] Sun X, Sun A, Jia X, Jin S, Zhang D, Xiao K, et al. In vitro bioactivity of AH plus with the addition of nano-magnesium hydroxide. *Ann Transl Med* 2020;8:313–313. <https://doi.org/10.21037/ATM.2020.02.133>.
- [8] Da Silva EJNL, Accorsi-Mendonça T, Pedrosa AC, Granjeiro JM, Zaia AA. Long-Term Cytotoxicity, pH and Dissolution Rate of AH Plus and MTA Fillapex. *Braz Dent J* 2016;27:419–23. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201600735>.
- [9] Jung S, Sielker S, Hanisch MR, Libricht V, Schäfer E, Dammaschke T. Cytotoxic effects of four different root canal sealers on human osteoblasts. *PLoS One* 2018;13. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0194467>.
- [10] López-García S, Pecci-Lloret MR, Guerrero-Gironés J, Pecci-Lloret MP, Lozano A, Llena C, et al. Comparative Cytocompatibility and Mineralization Potential of Bio-C Sealer and TotalFill BC Sealer. *Materials* 2019;12. <https://doi.org/10.3390/MA12193087>.
- [11] Sanz JL, López-García S, Rodríguez-Lozano FJ, Melo M, Lozano A, Llena C, et al. Cytocompatibility and bioactive potential of AH Plus Bioceramic Sealer: An in vitro study. *Int Endod J* 2022;55:1066–80. <https://doi.org/10.1111/IEJ.13805>.

- [12] Quaresma SAL, Alves dos Santos GN, Silva-Sousa AC, Camargo RV, Lopes-Olhê FC, Silva-Sousa YTC, et al. Physicochemical properties of calcium silicate cement based endodontic sealers. *J Mech Behav Biomed Mater* 2024;151. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2024.106400>.
- [13] Zamparini F, Prati C, Taddei P, Spinelli A, Di Foggia M, Gandolfi MG. Chemical-Physical Properties and Bioactivity of New Premixed Calcium Silicate-Bioceramic Root Canal Sealers. *Int J Mol Sci* 2022;23. <https://doi.org/10.3390/IJMS232213914>.
- [14] Donnermeyer D, Schemkämper P, Bürklein S, Schäfer E. Short and Long-Term Solubility, Alkalizing Effect, and Thermal Persistence of Premixed Calcium Silicate-Based Sealers: AH Plus Bioceramic Sealer vs. Total Fill BC Sealer. *Materials* 2022;15. <https://doi.org/10.3390/ma15207320>.
- [15] López-García S, Sánchez-Bautista S, García-Bernal D, Lozano A, Forner L, Sanz JL, et al. Premixed calcium silicate-based ceramic sealers promote osteogenic/cementogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells: A microscopy study. *Microsc Res Tech* 2024;87:1584–97. <https://doi.org/10.1002/JEMT.24545>.
- [16] Chen JH, Raman V, Kuehne SA, Camilleri J, Hirschfeld J. Chemical, Antibacterial, and Cytotoxic Properties of Four Different Endodontic Sealer Leachates Over Time. *J Endod* 2024. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2024.08.015>.
- [17] Shen H, Zhuang Y, Zhang C, Zhang C, Yuan Y, Yu H, et al. Osteoclast-Driven Osteogenesis, Bone Remodeling and Biomaterial Resorption: A New Profile of BMP2-CPC-Induced Alveolar Bone Regeneration. *Int J Mol Sci* 2022;23. <https://doi.org/10.3390/IJMS232012204>.
- [18] Acharya B, Chun SY, Kim SY, Moon C, Shin HI, Park EK. Surface immobilization of MEPE peptide onto HA/ β -TCP ceramic particles enhances bone regeneration and remodeling. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2012;100B:841–9. <https://doi.org/10.1002/JBM.B.32648>.
- [19] Liang M, Yin X, Zhang S, Ai H, Luo F, Xu J, et al. Osteoclast-derived small extracellular vesicles induce osteogenic differentiation via inhibiting ARHGAP1. *Mol Ther Nucleic Acids* 2021;23:1191–203. <https://doi.org/10.1016/J.OMTN.2021.01.031>.
- [20] Ma Q, Liang M, Wu Y, Luo F, Ma Z, Dong S, et al. Osteoclast-derived apoptotic bodies couple bone resorption and formation in bone remodeling. *Bone Res* 2021;9. <https://doi.org/10.1038/S41413-020-00121-1>.
- [21] Song C, Yang X, Lei Y, Zhang Z, Smith W, Yan J, et al. Evaluation of efficacy on RANKL induced osteoclast from RAW264.7 cells. *J Cell Physiol* 2019;234:11969–75. <https://doi.org/10.1002/JCP.27852>.

- [22] López-García S, Sánchez-Bautista S, García-Bernal D, Lozano A, Forner L, Sanz JL, et al. Premixed calcium silicate-based ceramic sealers promote osteogenic/cementogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells: A microscopy study. *Microsc Res Tech* 2024. <https://doi.org/10.1002/JEMT.24545>.
- [23] Guedes FR, Bonvicini JFS, de Souza GL, da Silva WHT, Moura CCG, Paranhos LR, et al. Cytotoxicity and dentin composition alterations promoted by different chemomechanical caries removal agents: A preliminary in vitro study. *J Clin Exp Dent* 2021;13:826–34. <https://doi.org/10.4317/JCED.58208>.
- [24] Jonkman JEN, Cathcart JA, Xu F, Bartolini ME, Amon JE, Stevens KM, et al. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adh Migr* 2014;8:440. <https://doi.org/10.4161/CAM.36224>.
- [25] Santiago MC, Gomes-Cornélio AL, de Oliveira LA, Tanomaru-Filho M, Salles LP. Calcium silicate-based cements cause environmental stiffness and show diverse potential to induce osteogenesis in human osteoblastic cells. *Sci Rep* 2021;11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96353-0>.
- [26] Zhu L, Wei H, Wu Y, Yang S, Xiao L, Zhang J, et al. Licorice isoliquiritigenin suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis in vitro and prevents inflammatory bone loss in vivo. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:1139–52. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2012.04.003>.
- [27] Lampiasi N, Russo R, Kireev I, Strelkova O, Zhironkina O, Zito F. Osteoclasts differentiation from murine RAW 264.7 cells stimulated by RANKL: Timing and behavior. *Biology (Basel)* 2021;10:1–21. <https://doi.org/10.3390/biology10020117>.
- [28] Nguyen LCH, Pham LNG, Van Pham K, Nguyen MD, Ngo LTQ. Cytocompatibility and cell migration evaluation of calcium silicate-based root canal sealer compared to epoxide-amine resin sealer in stem cells from human apical papilla: An in-vitro study. *Aust Endod J* 2023;49:554–62. <https://doi.org/10.1111/AEJ.12786>.
- [29] Souza LC de, Neves GST, Kirkpatrick T, Letra A, Silva R. Physicochemical and Biological Properties of AH Plus Bioceramic. *J Endod* 2023;49:69–76. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2022.10.009>.
- [30] Tian J, Qi W, Zhang Y, Glogauer M, Wang Y, Lai Z, et al. Bioaggregate Inhibits Osteoclast Differentiation, Fusion, and Bone Resorption In Vitro. *J Endod* 2015;41:1500–6. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2015.05.018>.
- [31] Cheng X, Zhu L, Zhang J, Yu J, Liu S, Lv F, et al. Anti-osteoclastogenesis of Mineral Trioxide Aggregate through Inhibition of the Autophagic Pathway. *J Endod* 2017;43:766–73. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2016.12.013>.
- [32] Chaweewannakorn W, Ariyoshi W, Okinaga T, Fujita Y, Maki K, Nishihara T. Ameloblastin attenuates RANKL-mediated osteoclastogenesis by suppressing

activation of nuclear factor of activated T-cell cytoplasmic 1 (NFATc1). *J Cell Physiol* 2019;234:1745–57. <https://doi.org/10.1002/JCP.27045>.

- [33] Lemieux JM, Wu G, Morgan JA, Kacena MA. DMSO regulates osteoclast development in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2011;47:260–7. <https://doi.org/10.1007/S11626-011-9385-8>.
- [34] Pan C, Chen L, Wu R, Shan H, Zhou Z, Lin Y, et al. Lithium-containing biomaterials inhibit osteoclastogenesis of macrophages in vitro and osteolysis in vivo. *J Mater Chem B* 2018;6:8115–26. <https://doi.org/10.1039/C8TB02678E>.
- [35] Zhang Y, Guan H, Li J, Fang Z, Chen W, Li F. Amlexanox Suppresses Osteoclastogenesis and Prevents Ovariectomy-Induced Bone Loss. *Sci Rep* 2015;5. <https://doi.org/10.1038/SREP13575>.
- [36] Kim JH, Kim N. Regulation of NFATc1 in Osteoclast Differentiation. *J Bone Metab* 2014;21:233. <https://doi.org/10.11005/JBM.2014.21.4.233>.
- [37] Sundaram K, Nishimura R, Senn J, Youssef RF, London SD, Reddy S V. RANK ligand signaling modulates the matrix metalloproteinase-9 gene expression during osteoclast differentiation. *Exp Cell Res* 2007;313:168–78. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2006.10.001>.
- [38] Liu J, Xiao Q, Xiao J, Niu C, Li Y, Zhang X, et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduct Target Ther* 2022;7. <https://doi.org/10.1038/S41392-021-00762-6>.
- [39] Gao Y, Chen N, Fu Z, Zhang Q. Progress of Wnt Signaling Pathway in Osteoporosis. *Biomolecules* 2023;13:483. <https://doi.org/10.3390/BIOM13030483>.
- [40] Weivoda MM, Ruan M, Hachfeld CM, Pederson L, Howe A, Davey RA, et al. Wnt Signaling Inhibits Osteoclast Differentiation by Activating Canonical and Noncanonical cAMP/PKA Pathways. *J Bone Miner Res* 2016;31:65–75. <https://doi.org/10.1002/JBMR.2599>.

CAPÍTULO 4

4. CAPÍTULO 4

4.1 DISCUSSÃO GERAL

Este estudo investigou as propriedades químicas e os efeitos biológicos do cimento AH Plus Biocerâmico (AHP-BIO) na endodontia, tendo em vista o crescente uso de materiais biocerâmicos na terapia endodôntica. A revisão de literatura, no capítulo 1, apresentou os avanços dos cimentos biocerâmicos, que, por suas características bioativas e biocompatíveis, têm se tornado uma ferramenta indispensável no uso clínico. A habilidade desses materiais de promover a cicatrização e regeneração periapical é muito valorizada, principalmente em casos que envolvem infecções e lesões extensas, onde o vedamento e a bioatividade são essenciais para o sucesso do tratamento a longo prazo.

No capítulo 2, a avaliação das propriedades químicas do AHP-BIO demonstrou que ele é um material favorável para uso em endodontia, apresentando boa liberação de íons de cálcio e pH alcalino, ambos associados ao potencial bioativo do material. Já que se sabe que o pH elevado e a liberação de cálcio, são fatores determinantes para a biocompatibilidade e a função antimicrobiana do material, aspectos os quais contribuem para o controle bacteriano e promoção de um ambiente favorável para o reparo dos tecidos periapicais. Além disso, a quantidade de sólidos dissolvidos permaneceu dentro dos padrões biocompatíveis, sugerindo que o AHP-BIO não induz toxicidade ao meio, o que o torna uma escolha adequada para os tratamentos endodônticos que exigem a utilização de materiais seguros e eficazes.

Por outro lado, os resultados apresentados no Capítulo 3 revelaram o efeito do AHP-BIO sobre a osteoclastogênese, evidenciando uma resposta significativa das células osteoclásticas RAW 264.7 ao material, que difere de resultados obtidos utilizando outros tipos de cimentos biocerâmicos. Observou-se um aumento na expressão de genes específicos dos osteoclastos, que estão associados à atividade osteoclástica. Esses genes desempenham papéis cruciais na capacidade dos osteoclastos de degradar a matriz mineralizada, e sua ativação sugere que o AHP-BIO pode aumentar a função dos osteoclastos. Esse estímulo à osteoclastogênese foi confirmado pelo aumento no número de osteoclastos multinucleados e na atividade da fosfatase ácida, indicando uma intensificação no processo de diferenciação

osteoclástica quando o AHP-BIO está presente.

Outro achado importante foi a inibição da via de sinalização Wnt, verificada a partir da baixa expressão das proteínas c-Myc e MMP-7. A via Wnt é conhecida por regular negativamente a osteoclastogênese, e com sua inibição pode favorecer o aumento da atividade osteoclástica. Isso sugere que o AHP-BIO pode ter um impacto indireto no equilíbrio entre formação e reabsorção óssea, o que é importante em casos clínicos onde se busca evitar uma reabsorção óssea excessiva.

Na prática clínica, esses resultados indicam que o AHP-BIO pode ser altamente eficaz em procedimentos endodônticos que necessitem de bom selamento bacteriano e regeneração tecidual. No entanto, seu efeito de indução da osteoclastogênese levanta cautela para sua aplicação em casos que exigem controle da reabsorção óssea, como em tratamentos endodônticos associado a grandes defeitos ósseos. Nesses casos, o aumento da atividade dos osteoclastos pode não ser desejável, pois pode intensificar a reabsorção óssea que já está em andamento. Dessa forma, é importante que os clínicos considerem o contexto biológico de cada caso antes de optar pelo uso do AHP-BIO como material de obturação.

Além disso, esse estudo aumenta o conhecimento sobre as interações entre cimentos biocerâmicos e células ósseas, demonstrando que nem todos os cimentos biocerâmicos afetam a osteoclastogênese da mesma forma. As propriedades químicas específicas de cada cimento e as alterações em suas composições podem influenciar as respostas celulares de diferentes formas.

Este estudo portanto contribui para um melhor entendimento das propriedades do AHP-BIO e ressalta a importância da seleção criteriosa de materiais em endodontia, onde cada caso deve ser tratado de forma individualizada. Os dados obtidos oferecem uma base para que os clínicos possam fazer escolhas mais precisas ao selecionar um cimento biocerâmico, garantindo que suas propriedades sejam consideradas em função do diagnóstico do paciente. Em resumo, por mais que o AHP-BIO apresente um excelente perfil bioativo e de selamento, seu impacto sobre a osteoclastogênese torna necessário que seu uso seja cuidadosamente indicado, especialmente em casos em que o controle da reabsorção óssea é um fator crucial para o sucesso do tratamento e conforto do paciente.

4.2 CONCLUSÕES

O cimento AH Plus Biocerâmico apresenta propriedades físicas, químicas e biológicas que atestam o seu uso em endodontia, especialmente para procedimentos que necessitam de um selamento eficaz e bioatividade por parte do cimento. A liberação de íons de cálcio e o pH alcalino confirmam seu potencial para contribuir com a regeneração dos tecidos periapicais. Contudo, sua ação na osteoclastogênese indica que o AHP-BIO pode não ser ideal para casos que exigem a inibição da atividade de reabsorção óssea, uma vez que nossos resultados demonstraram indução da atividade osteoclástica. Os resultados deste estudo fornecem portanto evidências para uma seleção clínica mais precisa dos casos em que o AHP-BIO pode ser indicado, levando em consideração o seu efeito na osteoclastogênese. Conclui-se que o AHP-BIO tem aplicação promissora na endodontia reparativa, mas seu uso deve levar em consideração as características específicas de cada caso clínico afim de otimizar os resultados terapêuticos.

5. CAPÍTULO 5 – Press Release

No tratamento endodôntico, cada etapa é crucial para garantir eficácia e longevidade do tratamento, desde a limpeza e modelagem do sistema de canais radiculares até a obturação final. A fase de obturação, responsável por selar tridimensionalmente o canal, previne a reinfecção e auxilia na cicatrização dos tecidos ao redor. O material utilizado nessa etapa precisa ter alta biocompatibilidade, pois pode entrar em contato direto com tecidos periapicais sensíveis. Recentemente, os cimentos biocerâmicos têm ganhado destaque como uma inovação na endodontia, devido à sua capacidade de selamento e propriedades que favorecem a biocompatibilidade. O AH Plus Biocerâmico (AHP-BIO) é um dos novos cimentos biocerâmicos no mercado, composto por dióxido de zircônia e silicato tricálcico, com diferencial por sua menor proporção de silicatos de cálcio, além de incluir dimetilsulfóxido (DMSO) e carbonato de lítio. Este estudo avaliou as propriedades químicas do AHP-BIO e seu impacto na osteoclastogênese, um processo fundamental para a remodelação óssea. Os resultados mostraram que o AHP-BIO possui qualidades químicas adequadas para uso em tratamentos odontológicos, mas indicaram também que, ao contrário de outros biocerâmicos, o AHP-BIO estimula a osteoclastogênese em células RAW 264.7. Isso significa que, em casos de grandes lesões ósseas, onde a inibição da reabsorção óssea é essencial para uma cicatrização mais rápida, o AHP-BIO pode não ser a melhor escolha. Essas descobertas fornecem uma base científica importante para os profissionais da odontologia, ajudando-os a determinar a melhor indicação clínica para o uso do AHP-BIO em terapia endodôntica, de forma a otimizar os resultados clínicos obtidos.