

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



Tese de Doutorado

**BIOCOMPATIBILIDADE E POTENCIAL BIOATIVO DE CIMENTOS
ENDODÔNTICOS OBTURADORES E REPARADORES BIOCERÂMICOS**

Marcos Coelho Santiago

Brasília 2025

Marcos Coelho Santiago

**BIOCOMPATIBILIDADE E POTENCIAL BIOATIVO DE CIMENTOS
ENDODÔNTICOS OBTURADORES E REPARADORES BIOCERÂMICOS**

Tese 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 Doutor em Odontologia

Orientadora: Prof. Dra. Loise Pedrosa Salles

Brasília, 2025

Marcos Coelho Santiago

BIOCOMPATIBILIDADE E POTENCIAL BIOATIVO DE CIMENTOS
ENDODÔNTICOS OBTURADORES E REPARADORES BIOCERÂMICOS

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

Data da defesa:

Banca examinadora:

Prof. Dr. Loise Pedrosa Salles (Orientador)

Prof. Dr. Laudimar Alves de Oliveira

Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho

Prof. Dr. Adriana Anunciatto Depieri

Prof. Dr. Naile Dame Teixeira (Suplente)

Aos meus pais, Edmond e Ester, pelo apoio constante e pela confiança nas minhas escolhas mais importantes. Aos meus irmãos Lucas e Marina (in memoriam), e à Thais, que, mesmo nos momentos mais desafiadores, sempre estiveram ao meu lado, incentivando-me a seguir em frente e tornando esta conquista possível.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço imensamente à minha orientadora, Prof. Dra. Loise Pedrosa Salles, por me apresentar ao fascinante universo da pesquisa laboratorial e por ser uma fonte constante de inspiração. Seu entusiasmo, dedicação e profissionalismo foram fundamentais para meu crescimento acadêmico e pessoal. Obrigado pela atenção e carinho com os quais sempre me acolheu.

À Thais por sempre me apoiar e estar presente nos momentos mais difíceis e desafiadores.

À minha família, por ser minha base sólida e por sempre acreditar em mim, oferecendo o apoio incondicional necessário para que eu seguisse em frente. Agradeço de coração ao meu pai, minha mãe, ao Lucas e à Marina, pela força e incentivo constantes.

Aos meus amigos da Equipe Master – Rodrigo Aucélio, Marcio Amaral e Poliana – por sempre me incentivarem a buscar novos desafios e conquistas. O apoio de vocês foi essencial para minha jornada.

Ao Rafael, que se dedicou incansavelmente para me auxiliar nos experimentos laboratoriais. Sua colaboração foi de extrema importância.

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, em especial à Prof. Dra. Nailê Damé Teixeira, que sempre incentivou minha trajetória na pesquisa e foi uma referência ao longo de minha formação.

Ao meu amigo e sócio, Artur, por garantir o funcionamento e a administração da nossa clínica, além de sempre estar ao meu lado, oferecendo amizade, companheirismo e apoio nas minhas decisões.

Às amigas e parceiras da IEEP Odontologia, que, mesmo na minha ausência, se dedicaram a organizar tudo o que fosse necessário, nunca medindo esforços para me apoiar em qualquer momento de necessidade.

A todos vocês, meu sincero agradecimento. Sem o apoio, carinho e dedicação de cada um, esta conquista não seria possível.

RESUMO

Atualmente, os cimentos à base de silicato de cálcio são considerados materiais de escolha para o tratamento reparador de perfuração radicular e cirurgias apicais. Ao longo dos anos, esses materiais vêm sendo aperfeiçoados, culminando na consolidação dos cimentos biocerâmicos para esse tipo de tratamento. Seu potencial bioativo, biocompatibilidade e tolerância à umidade também os credenciam como opção para obturação do sistema de canais radiculares. O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades biológicas dos cimentos biocerâmicos reparadores em cultura de células osteoblásticas humanas, bem como dos cimentos biocerâmicos obturadores em cultura de células osteoblásticas humanas e células pulpares. O estudo foi dividido em 5 capítulos: No capítulo 1, foi apresentada uma introdução sobre as propriedades e indicações dos cimentos biocerâmicos na endodontia, assim como sua utilização como cimento reparador em tratamentos regenerativos. Uma revisão da literatura também foi realizada com pesquisas atuais que contribuíram para a execução deste trabalho. No capítulo 2, foi apresentado um ebook publicado sobre um cimento obturador recentemente lançado no mercado, o AH Plus® Bioceramic Sealer. Foi feita uma revisão de literatura com artigos mais recentes sobre suas propriedades biológicas e físico-químicas, assim como sobre sua composição. Adicionalmente, foram descritos três casos clínicos de sucesso utilizando o AH Plus® Bioceramic Sealer como cimento obturador. No capítulo 3, foi apresentado um estudo sobre cimentos obturadores que podem entrar em contato direto com diferentes tipos de células e causar reações adversas ou estimular a mineralização. No estudo, foram comparadas a viabilidade celular (MTT), a área de proliferação (*Ensaio Wound Healing*) e o potencial de mineralização (fixação de cálcio por coloração com vermelho de Alizarina) da polpa humana e das células osteoblásticas após exposição aos cimentos AH Plus® Bioceramic, Bio-C® Sealer, NeoMTA Plus® e MTA-FILLAPEX®. No capítulo 4, foi apresentado um estudo comparativo do potencial de induzir mineralização de cimentos reparadores biocerâmicos em cultura de células do tipo osteoblastos humanos (Saos-2). Os resultados obtidos neste estudo compõem o artigo publicado no periódico Scientific Reports – Nature. O objetivo

deste trabalho foi avaliar a bioatividade de dois cimentos biocerâmicos reparadores de destaque no Brasil, Bio-C® Repair e PBS HP®, que foram disponibilizados com a promessa de apresentarem propriedades biológicas superiores aos cimentos convencionais. O artigo na íntegra está em anexo à esta dissertação e contém os resultados dos experimentos de viabilidade celular (MTT), proliferação celular (ensaio de *Wound Healing*) e bioatividade por PCR em tempo real (qPCR) dos genes marcadores de osteogênese (*BGLAP*, *ALPL* e *BSP*), atividade enzimática (ALP) e o potencial de mineralização. Nos capítulos 5 e 6, foram apresentadas as considerações finais sobre os cimentos endodônticos biocerâmicos obturadores e reparadores, bem como um press release, respectivamente.

Palavras-chave: Cimento de Silicato. Cimentos Dentários. Obtenção do Canal Radicular

ABSTRACT

Currently, calcium silicate-based cements are considered the materials of choice for the reparative treatment of root perforation and apical surgeries. Over the years, these materials have been improved, culminating in the consolidation of bioceramic cements for this type of treatment. Their bioactive potential, biocompatibility, and moisture tolerance also qualify them as a suitable option for the obturation of the root canal system. The aim of this study was to evaluate the biological properties of reparative bioceramic cements in human osteoblastic cell cultures, as well as obturation bioceramic cements in human osteoblastic and pulpal cell cultures. The study was divided into five chapters: In Chapter 1, an introduction was presented regarding the properties and indications of bioceramic cements in endodontics, as well as their use as reparative cement in regenerative treatments. A literature review was also conducted, covering current research that contributed to the execution of this work. In Chapter 2, an ebook published about a recently launched obturation cement, AH Plus® Bioceramic Sealer, was presented. A literature review was conducted, focusing on recent articles regarding its biological and physicochemical properties, as well as its composition. Additionally, three successful clinical cases using AH Plus® Bioceramic Sealer as an obturation cement were described. In Chapter 3, a study was presented on obturation cements that can come into direct contact with different types of cells, potentially causing adverse reactions or stimulating mineralization. In this study, the cellular viability (MTT), proliferation area (Wound Healing Assay), and mineralization potential (calcium deposition by Alizarin Red staining) of human pulp and osteoblastic cells were compared after exposure to AH Plus® Bioceramic, Bio-C® Sealer, NeoMTA Plus®, and MTA-FILLAPEX® cements. In Chapter 4, a comparative study of the mineralization-inducing potential of reparative bioceramic cements in cultures of human osteoblast-like cells (Saos-2) was presented. The results obtained in this study are part of an article published in the journal *Scientific Reports – Nature*. The aim of this study was to evaluate the bioactivity of two prominent bioceramic reparative cements in Brazil, Bio-C® Repair and PBS HP®, which were marketed with claims of superior biological properties compared to conventional cements. The full article is attached to this dissertation and contains the results of experiments on cellular

viability (MTT), cellular proliferation (Wound Healing assay), and bioactivity through real-time PCR (qPCR) of osteogenesis marker genes (BGLAP, ALPL, and BSP), enzymatic activity (ALP), and mineralization potential. In Chapters 5 and 6, the final considerations regarding bioceramic obturation and reparative endodontic cements, as well as a press release, were presented, respectively.

Keywords: Silicate Cement. Dental Cements. Root Canal Obturation

TABELA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MTA	Agregado Trióxido Mineral
CaSiO	Silicato de Cálcio
BiO	Óxido de Bismuto
CaCO	Carbonato de Cálcio
CaSO	Sulfato de Cálcio
CaAlO	Aluminato de Cálcio
MTT	{brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}
FTIR	Fourier transform infrared
XRD	X-ray diffraction
Bio-C	Bio-C® Repair
AHP-B	AH Plus® Bioceramic
PBS-HP	PBS HP®
MTA-HP	MTA Repair-HP
ProRoot	ProRoot® MTA
NeoMTA-P	NeoMTA Plus®
MTA-F	MTA-FILLAPEX®
ZOE	Cimento de Óxido de Zinco e Eugenol
CT	Grupo Controle
<i>ALPL</i>	<i>Alkaline phosphatase tissue-nonspecific gene</i>
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i> (reação de polimerização em cadeia)
qPCR	<i>Real time PCR</i> (reação de polimerização em cadeia em tempo real)
<i>BGLAP</i>	<i>Bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein gene</i>
<i>BSP</i>	<i>Bone Sialoprotein gene</i>
HA	Hidroxiapatita
DMEM	Meio Dulbecco Eagle Modificado
SFB	Soro Fetal Bovino
<i>GAPDH</i>	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão fosfato-salino)

ALP	Enzima Fosfatase Alcalina
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
CaSR	Receptores extracelulares sensíveis a cálcio
L929	Linhagem de fibroblastos embrionários de camundongos
Saos-2	Linhagem celular de osteosarcoma humano
FMM1	Linhagem de fibroblastos da mucosa oral humana
MC3T3-E1	Linhagem de células osteoblásticas de rato
ANOVA	Teste de análise de variância
IRM	<i>Intermediate Restorative Material</i>
Ca ²⁺	Íons cálcio
cAMP	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico/mensageiro celular
Atf6	Fator 6 de transcrição
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
HAP	Cristais de Hidroxiapatita
ZrO ₂	Zircônia
hPDLSCs	Células do ligamento periodontal humano
hDPCs	Células da polpa dentária humana
ARS	Coloração Vermelho Alizarina
DMSO	dimetil sulfóxido

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO 1 – BIOCERÂMICOS NA ENDODONTIA	
1.1 INTRODUÇÃO	13
1.2 REVISÃO DA LITERATURA	15
1.2.1 Cimentos Bicerâmicos Reparadores.....	16
1.2.2 Cimentos Biocerâmicos Obturadores	23
1.3 OBJETIVOS	27
1.4 REFERÊNCIAS	29
2. CAPÍTULO 2 - AH PLUS BIOCERÂMICO: O NOVO PADRÃO OURO EM CIMENTOS OBTURADORES?	
2.1 INTRODUÇÃO	37
2.2 COMPOSIÇÃO DO CIMENTO ENDODÔNTICO BIOCERÂMICO	39
2.3 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS	43
2.4 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	46
2.5 CASOS CLÍNICOS	50
2.6 CONCLUSÃO	55
2.6 REFERÊNCIAS	55
3. CAPÍTULO 3 - ANÁLISE COMPARATIVA DA VIABILIDADE CELULAR, PROLIFERAÇÃO E POTENCIAL DE MINERALIZAÇÃO DE CIMENTOS ENDODÔNTICOS BIOCERÂMICOS EM POLPA HUMANA E CÉLULAS OSTEOBLÁSTICAS	
3.1 INTRODUÇÃO	64
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	65
3.3 RESULTADOS	69
3.4 DISCUSSÃO	77
3.5 CONCLUSÃO	82
3.6 REFERÊNCIAS	83
4. CAPÍTULO 4 – CIMENTOS A BASE DE SILICATO DE CALCIO MOSTRAM DIVERSO POTENCIAL PARA INDUZIR OSTEOGÊNESE EM CÉLULAS OSTEOBLÁSTICAS HUMANAS	
4.1 INTRODUÇÃO	90
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	93

4.3 RESULTADOS	98
4.4 DISCUSSÃO	101
4.5 REFERÊNCIAS	104
5. CAPÍTULO 5	
5.1 DISCUSSÃO GERAL	110
5.2 CONCLUSÕES	112
6. CAPÍTULO 6 – Press Release	113

ANEXOS

CAPÍTULO 1

Revisão de Literatura

Biocerâmicos na Endodontia

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

A polpa radicular desempenha um papel importante na vitalidade e nutrição do dente, sendo composta por tecido conjuntivo, artérias sanguíneas e nervos. A exposição a agentes externos, como cárie, trauma ou restaurações, pode levar à infecção ou inflamação da polpa, resultando em dor e desconforto intensos. Se não tratada, essa condição pode progredir até a perda dentária [1]. Em situações em que não é possível preservar a vitalidade da polpa, o tratamento endodôntico torna-se necessário. Os objetivos dessa terapia incluem o debridamento, desinfecção, preparo biomecânico e obturação do sistema de canais radiculares.

Um fator crucial para o êxito do tratamento endodôntico é a compreensão aprofundada da complexidade anatômica dos dentes e das estruturas que os circundam [2]. A complexidade da anatomia dentária, caracterizada pela presença de canais acessórios, deltas apicais, curvaturas acentuadas, istmos e diversas ramificações, torna o tratamento endodôntico desafiador [2]. É fundamental destacar que a inexperiência profissional e a falta de conhecimento sobre a anatomia interna dos dentes são as principais causas de falhas, resultando em recontaminação dos condutos, perfurações radiculares e lesões apicais persistentes [3]. A integração dessas etapas visa, principalmente, a eliminação de microrganismos e seus subprodutos, seguida de um selamento hermético do sistema de canais radiculares com um material obturador que favoreça ou até mesmo induza o reparo dos tecidos adjacentes [1]. Porém, algumas situações desagradáveis podem ocorrer durante ou após a terapia endodôntica. A perfuração radicular é uma das iatrogenias mais comuns na endodontia, seu tratamento exige, além de conhecimento e habilidade do operador, materiais que promovam o reparo da região.

O prognóstico do tratamento dessas perfurações radiculares depende principalmente da localização da perfuração e da possibilidade de acesso direto ao local afetado. Independentemente da causa, o tratamento das perfurações envolve a localização do problema, descontaminação e preenchimento com um material biocompatível que ofereça vedamento eficaz, seja insolúvel e tolere a

umidade [5]. De modo geral, perfurações radiculares não tratadas, lesões apicais persistentes, tratamentos regenerativos e dentes com ápices incompletos são situações desafiadoras em Endodontia. Além da habilidade profissional, o uso de materiais biocompatíveis e preferencialmente bioativos é desejável. O sucesso no reparo das estruturas afetadas depende diretamente das propriedades biológicas dos materiais utilizados, que devem estimular a proliferação e atividade de células cementoblásticas e osteoblásticas [6,7].

As propriedades biológicas dos materiais utilizados como obturadores ou reparadores são essenciais para o sucesso da terapia endodôntica. Novos materiais foram desenvolvidos tanto para a obturação de canais radiculares quanto para o selamento de perfurações. Como resultado, materiais como amálgama, cimentos de ionômero de vidro, cimentos à base de resina e cimentos à base de óxido de zinco-eugenol foram gradualmente substituídos [8,9]. Na década de 1990, o Agregado Trióxido Mineral (MTA) foi introduzido no mercado odontológico, atendendo a vários requisitos biológicos fundamentais [10]. Originalmente desenvolvido como material retro-obturador, o MTA foi rapidamente reconhecido por diversos estudos como o melhor material para cirurgias apicais e selamento de perfurações radiculares. Posteriormente, cimentos obturadores também foram lançados incorporando MTA em sua composição [10]. Nos últimos anos, os cimentos obturadores e reparadores à base de silicato de cálcio têm sido aprimorados, com vários estudos mostrando resultados promissores. O MTA, considerado o biocerâmico de primeira escolha para o tratamento de perfurações radiculares, destaca-se na endodontia devido às suas excelentes propriedades biológicas. É importante destacar que esses cimentos se referem a materiais cerâmicos de uso biológico, que podem ser inertes ou bioativos [10,11]. Entretanto, longos tempos de presa, possíveis descolorações dentárias e propriedades de manuseio desafiadoras foram observados como potenciais desvantagens do MTA [12].

Os biocerâmicos têm sido utilizados na medicina e odontologia desde a década de 1970 [13]. Inicialmente empregados para o recobrimento de metais, os cimentos biocerâmicos são compostos principalmente de fosfato de cálcio, silicato de cálcio, cerâmicas de vidro, alumina, zircônia e hidroxiapatita, proporcionando-lhes biocompatibilidade e bioatividade [11,14,15]. Os cimentos biocerâmicos têm sido propostos como alternativas ao MTA, com a premissa de

possuírem propriedades físico-químicas e biológicas superiores [16]. À medida que novos biocerâmicos são desenvolvidos, torna-se necessário realizar estudos comparativos para determinar a eficácia de diferentes tipos de cimentos reparadores e obturadores a base de silicato de cálcio. Estudos em cultura de células fornecem informações valiosas que contribuem cientificamente para o aprimoramento da endodontia e orientam a escolha do material ideal para cada situação clínica. Com base nessa premissa, o objetivo deste trabalho foi avaliar a biocompatibilidade e o potencial bioativo de cimentos endodônticos biocerâmicos reparadores e obturadores em cultura de células ósseas e pulpares humanas [6].

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

A obturação do sistema de canais radiculares e o manejo de complicações decorrentes do tratamento endodôntico têm sido foco de numerosos estudos ao longo do tempo. Grosman *et al.* (1988) [17] delinearam as características ideais de um cimento endodôntico, porém, até hoje nenhum material conseguiu atender plenamente a todas essas expectativas [18].

Recentemente, cimentos biocerâmicos surgiram com propriedades que se aproximam das características ideais [19]. Esses cimentos são compostos por cerâmicas biocompatíveis obtidas através de processamentos químicos, resultando em uma substância que imita o processo de formação da hidroxiapatita e induz uma resposta reparadora [19]. A utilização de cimentos biocerâmicos em tratamentos endodônticos de rotina e para complicações associadas tem se tornado mais comum.

Vários estudos destacam as propriedades desse material, incluindo biocompatibilidade, capacidade de manter um pH elevado, facilidade de manipulação, tolerância à umidade e estabilidade dimensional [15,19,20]. Esses materiais interagem com a água e os fluidos presentes no ambiente, resultando na formação de hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) por meio de uma reação de hidratação. Essa reação libera íons de cálcio e hidroxila, levando à formação de hidroxiapatita na superfície do material. Materiais à base de silicato de cálcio são considerados biomateriais devido à sua excelente biocompatibilidade e capacidade de interação com tecidos [21]. Atualmente, os cimentos

biocerâmicos podem ser utilizados como reparadores em diversos procedimentos endodônticos, incluindo o reparo de perfurações, reabsorções, a aplicação de barreiras apicais, o reparo endodôntico guiado, o tratamento de polpa vital e cirurgias endodônticas. Em outra possibilidade, os cimentos biocerâmicos também podem ser empregados para a obturação de canais radiculares, utilizando-se tanto técnicas a frio quanto técnicas a quente com guta-percha [22].

1.2.1 CIMENTOS BIOCERÂMICOS REPARADORES

Nos últimos anos, têm sido conduzidas pesquisas comparativas entre os cimentos biocerâmicos e o MTA em relação a outros produtos mais antigos no mercado. Os resultados destacam principalmente a melhor biocompatibilidade, eficácia no selamento e, especialmente, a resistência à umidade desses materiais [23,24]. O MTA é composto por uma combinação de silicato de cálcio (CaSiO), óxido de bismuto (BiO), carbonato de cálcio (CaCO), sulfato de cálcio (CaSO) e aluminato de cálcio (CaAlO). Após a hidratação, o material solidifica-se em cristais discretos em uma matriz amorfa, sendo os cristais compostos por óxido de cálcio, enquanto a região amorfa consiste em 33% de cálcio, 49% de fosfato, 2% de carbono, 3% de cloreto e 6% de sílica [23]. Por outro lado, os cimentos biocerâmicos são compostos por silicatos tricálcicos e dicálcicos, fosfatos de cálcio, hidróxido de cálcio e óxido de zircônia como radiopacificador. Assim como o MTA, eles iniciam sua presa na presença de umidade e estão disponíveis em duas formas: pó-líquido ou "prontos para uso" [25].

Um dos primeiros produtos à base de MTA a ser comercializado foi o ProRoot® MTA. Inicialmente na cor cinza e contendo metais em sua composição, sua limitação notável era a possibilidade de alteração na cor dos dentes tratados. Posteriormente, uma versão branca foi introduzida, livre de alumínio e arsênico, abrindo caminho para cimentos à base de silicato de cálcio mais puros, substituindo a fórmula original do cimento Portland [6]. De acordo com a literatura, essa versão branca demonstra capacidade de manter um pH elevado, o que favorece o reparo e a neoformação óssea [16]. No entanto, os cimentos à base de MTA ainda apresentam algumas limitações, especialmente em relação à manipulação, potencial manchamento da estrutura dentária e

tempo de presa [26,27,28]. Para mitigar essas limitações, pesquisou-se os efeitos de várias adições e alterações no MTA. Originalmente, o óxido de bismuto, usado como radiopacificador, foi identificado como principal responsável pelo escurecimento da dentina. A penetração de partículas na dentina e sua subsequente coloração após o contato com o hipoclorito de sódio foram associadas à mudança de cor. Esse escurecimento foi atribuído à instabilidade do óxido de bismuto quando exposto a um forte agente oxidante, formando carbonato de bismuto em reação com dióxido de carbono atmosférico. Alternativamente, propôs-se substituí-lo por óxido de zircônia ou tungstato de cálcio, pois, mesmo penetrando na dentina, não causaram pigmentação, mesmo após contato com hipoclorito de sódio [29]. Adicionalmente, compostos como cloreto de cálcio, formiato de cálcio e nitrato de cálcio foram sugeridos como aditivos para acelerar o tempo de presa inicial do MTA [30]. Para superar essas desvantagens, os cimentos à base de MTA têm passado por melhorias e modificações em sua composição original.

As primeiras propostas de cimentos biocerâmicos reparadores como alternativas ao MTA surgiram em 2009, com o lançamento do Biodentine e do Bioaggregate [31]. Suas composições são semelhantes às do MTA, sendo ambos cimentos à base de silicato de cálcio. No entanto, o Biodentine contém óxidos de cálcio, enquanto o Bioaggregate possui fosfatos de cálcio [32]. Assim, os materiais biocerâmicos são vistos como variações na composição do MTA [33].

Os cimentos biocerâmicos mais recentes têm mostrado resultados promissores. Com propriedades de biocompatibilidade e bioatividade, esses cimentos também iniciam a presa na presença de umidade e parecem ser mais fáceis de manipular em comparação com o MTA puro, que é recomendado principalmente para casos cirúrgicos [32]. De acordo com as informações fornecidas pelos fabricantes, a principal diferença na composição dos novos cimentos biocerâmicos em relação aos cimentos MTA originais é a inclusão de óxidos de cálcio, carbonato de cálcio e fosfatos de cálcio nos. Ambos os tipos de material contêm silicatos de cálcio, além de agentes radiopacificadores e componentes de presa.

A capacidade de manter um pH elevado na região afetada é uma característica bem estabelecida do hidróxido de cálcio e do MTA, essencial para

o reparo de áreas contaminadas [16]. Em um estudo realizado por Hansen SW et al. (2011) [16], foi comparada a capacidade do hidróxido de cálcio, do MTA e do cimento biocerâmico EndoSequence Root Repair™ de manter um pH alcalino no meio externo. Dentes humanos unirradiculares extraídos foram utilizados, com cavidades preparadas na superfície radicular com espessuras de 2 mm e 5 mm. As amostras foram divididas em grupos, e essas cavidades foram preenchidas com ProRoot® MTA branco e EndoSequence Root Repair™. O controle positivo foi preenchido com hidróxido de cálcio e o controle negativo com solução salina. O pH foi medido aos 20 minutos, 3 horas, 24 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas e 4 semanas. Entre 20 minutos e 3 horas, não houve diferença estatística no pH entre as amostras com ProRoot MTA branco e EndoSequence Root Repair™ em ambos os níveis. Ao final das 4 semanas, o pH foi semelhante para os dois materiais, 7,4 (EndoSequence) e 7,7 (ProRoot) [16].

1.2.1.1 Perfuração Radicular

A perfuração radicular é a comunicação entre o sistema de canais radiculares e a superfície externa do dente. Isso pode ocorrer patologicamente devido a cáries dentárias, reabsorção radicular ou como resultado de um acidente durante procedimentos. Se não forem devidamente reparadas, as perfurações radiculares podem levar à deterioração do periodonto e, eventualmente, à perda do dente [22].

Cimentos a base de silicato de cálcio são originariamente utilizados para reparo de perfurações radiculares e de furca, obturação radicular, selamento endodôntico, capeamento pulpar direto e pulpotomias. Possuem biocompatibilidade aceitável e estimulam o crescimento de fibroblastos, osteoblastos, cementoblastos, células estromais da medula óssea e células pulpares [34]. Estudos recentes indicam que esta categoria de cimentos apresenta excelente biocompatibilidade, principalmente devido à liberação de íons de cálcio e à manutenção da alcalinidade do meio. Esses fatores estimulam a formação de hidroxiapatita e a liberação de fosfatase alcalina, ambos cruciais para o processo de mineralização nos casos de perfuração radicular [35].

Diversos estudos têm avaliado o desempenho dos cimentos de silicato de cálcio no reparo de perfurações, analisando a capacidade de vedação, resistência de união, adaptação marginal, resistência à fratura e qualidade da obturação. De modo geral, esses estudos indicam que os cimentos biocerâmicos têm um bom desempenho como material de reparo para perfurações [22]. Clinicamente, a resistência da ligação do material ao dente é fundamental para mantê-lo estável no local, preservando sua integridade sob cargas causadas por forças oclusais ou procedimentos restauradores. Por outro lado, além da força de ligação, outras propriedades como o tempo de presa, a interação com fluidos teciduais e a resistência à compressão podem influenciar o comportamento clínico do material [36]. Estudos recentes indicam que a resistência e a capacidade de selamento de perfurações dos cimentos biocerâmicos atuais presentes no mercado superam as do MTA original, tornando-os recomendados para este tipo de procedimento [36, 37, 38].

Embora seja esperado que todo cimento endodôntico apresente biocompatibilidade, muitos desses cimentos são citotóxicos logo após serem manipulados e inseridos nos canais radiculares. No entanto, essa citotoxicidade tende a diminuir após a presa final [31, 39]. O tempo de presa deve ser suficiente para a inserção adequada do material, mas períodos excessivamente longos de endurecimento, combinados com a solubilidade do material, podem facilitar a difusão de componentes nocivos para os tecidos dentários [40]. A cicatrização e a indução do reparo não são prejudicadas pelo cimento, desde que não sejam afetadas por produtos resultantes de sua decomposição ao longo do tempo [41].

1.2.1.2 Reabsorções

A reabsorção radicular, caracterizada pela deterioração do tecido dental duro devido à atividade macrofágica, pode ocorrer tanto nos dentes decíduos, onde geralmente é fisiológica e benéfica, quanto nos dentes permanentes. Esta reabsorção pode se manifestar dentro do canal radicular ou na superfície externa da raiz, podendo progredir até a coroa do dente em estágios avançados. Independentemente de sua origem, é um processo irreversível e geralmente patológico, podendo causar desconforto para o paciente e até mesmo a perda prematura do dente afetado [42].

O tratamento de reabsorções radiculares demanda habilidade técnica e o uso de materiais capazes de fortalecer a estrutura comprometida e promover a cicatrização. Nesse sentido, os cimentos biocerâmicos surgem como uma opção preferencial, não apenas por repararem os danos extensos causados por essa condição, mas também por impedirem a disseminação de infecções bacterianas, assegurando um fechamento eficaz [43].

Quando se depara com uma perfuração na parede do canal radicular, uma abordagem que combina acesso cirúrgico e tratamento endodôntico ou uma abordagem não cirúrgica com foco interno para selar a lesão pode ser adotada. Nesse contexto, materiais reparadores à base de silicato de cálcio têm se destacado [44].

Para tratar a reabsorção cervical, diversos materiais biocerâmicos, como o agregado de trióxido mineral (MTA), têm sido empregados. Sua composição, que inclui silicatos de cálcio, fosfato de cálcio monobásico, óxido de zircônio, óxido de tântalo, agentes de reforço e agentes coagulantes, proporciona características como biocompatibilidade, capacidade hidrofílica, pH elevado e resistência à descoloração. Estudos indicam que esses materiais não apenas reparam a reabsorção, mas também estimulam o crescimento e a adesão das células periodontais, tornando-os uma escolha preferencial para esse tipo de tratamento [45, 46]

1.2.1.3 Barreira Apical

Lesões dentárias traumáticas são mais comuns em crianças de 8 a 12 anos. As lesões tendem a ocorrer principalmente nos dentes anteriores superiores, com maior frequência no incisivo central superior (36%). Essas lesões podem resultar em necrose pulpar, o que pode interromper a formação de raízes nos dentes em desenvolvimento deixando o ápice com formação incompleta [47]. A apicificação utilizando hidróxido de cálcio é um tratamento conhecido que visa estimular a formação de uma barreira apical, com taxas de sucesso que variam entre 79% e 96% [47]. No entanto, esse tratamento apresenta desvantagens, como a necessidade de várias consultas, aumentando o risco de reinfecção e fratura radicular [48]. Com o surgimento do MTA e os comercialmente denominados biocerâmicos, a barreira apical, realizada em uma

ou duas sessões passou a ser uma opção interessante para tratamento em dentes com ápice aberto [49].

O MTA (agregado de trióxido mineral) tem se destacado como material de escolha para a formação de barreiras apicais, devido à sua excelente capacidade de selamento radicular, biocompatibilidade e potencial para induzir a formação de tecido duro apical [50]. Embora o MTA seja eficaz para uso clínico, ele apresenta algumas desvantagens, como tempo de presa prolongado, dificuldade de manuseio e risco de descoloração. Recentemente, novos materiais biocerâmicos foram desenvolvidos para superar essas limitações. Esses materiais liberam hidróxido de cálcio, que, ao interagir com os fluidos dos tecidos, resulta na formação de hidroxiapatita [51]. Os cimentos à base de silicato de cálcio passaram a ser recomendados para a obturação radicular retrógrada, reparo de perfurações, terapia pulpar vital e indução do fechamento apical em dentes com desenvolvimento radicular incompleto, devido à sua excelente capacidade de selamento, biocompatibilidade, propriedades regenerativas e ação antibacteriana [52].

1.2.1.4 Cirurgia Apical

A cirurgia apical endodôntica, indicada para casos de insucesso ou onde a terapia endodôntica não é mais possível, evoluiu muito nas últimas duas décadas principalmente devido a utilização materiais reparadores a base de silicato de cálcio como o MTA [53]. Essa técnica consiste na remoção da porção apical e preparação de um espaço para receber o material reparador. Historicamente, o amálgama, cimentos obturadores, ionômero de vidro e até resinas compostas foram propostos como materiais retro obturadores, porém, suas características não colaboravam para o sucesso dessa terapia. A partir da década de 90 com o MTA e mais recentemente com os cimentos biocerâmicos os índices de sucesso aumentaram consideravelmente, superando 90%. Estudos *in vivo* reportaram uma reação inflamatória de intensidade leve e com formação de tecido sobre o MTA e reparo do ligamento periodontal. Essa resposta celular dificilmente pode ser obtida quando utilizado materiais como IRM e Super-EBA [54].

Considerando a presença constante de sangue durante o ato cirúrgico, a tolerância a umidade dos cimentos a base de silicato de cálcio os torna uma

excelente escolha. Adicionalmente, a capacidade de vedação, biocompatibilidade e bioatividade são apontados com principais responsáveis pelo bom prognóstico em casos cirúrgicos [55].

Os cimentos biocerâmicos já se consolidaram na prática clínica, sendo cada vez mais utilizados, especialmente em casos complexos que requerem intervenção cirúrgica. Suas propriedades físico-químicas, biocompatibilidade e bioatividade têm sido destacadas em pesquisas recentes, justificando sua proposta em tratamentos reparadores [3,11,14,15]. Hoje, situações clínicas que tradicionalmente empregavam o MTA podem ser tratadas com cimentos biocerâmicos biocompatíveis, bioativos e de fácil manuseio, especialmente aqueles com formulações “prontas para uso” [56]. A literatura apresenta estudos sobre essas novas formulações, mas um exemplo relevante é o trabalho de Benetti et al. (2019) [56], que avaliou a citotoxicidade, biocompatibilidade e capacidade de biomineralização do cimento "pronto-para-uso" Bio-C® Repair (Angelus) em comparação ao MTA Repair HP (Angelus) e ao MTA branco (Angelus) em fibroblastos L929 de camundongos. As células foram expostas a diferentes concentrações dos extratos dos materiais e avaliadas após 6, 24 e 48 horas. A maioria das amostras mostrou viabilidade celular dependente da dose, comparada ao grupo controle. Os autores concluíram que o Bio-C Repair "pronto-para-uso" é biocompatível e possui propriedades semelhantes ao MTA Repair HP e ao MTA branco, destacando-se pela facilidade de aplicação nas áreas afetadas [56]. No entanto, estudos semelhantes em células humanas envolvidas no processo de reparo endodôntico são necessários, dado que o Bio-C® Repair é um material relativamente novo e a literatura sobre ele ainda é limitada.

Outros cimentos biocerâmicos reparadores, como o Biodentine, que é apresentado em forma de pó-líquido, também foram amplamente estudados devido às suas propriedades biológicas interessantes [57]. Um estudo de Gomes-Cornélio AL et al. (2015) [57] comparou a bioatividade do Biodentine™ com o MTA Plus em células Saos-2, expondo-as a diferentes diluições dos extratos dos materiais por 24 horas e avaliando a viabilidade celular através do ensaio MTT. Os resultados indicaram que a biocompatibilidade dos materiais é dependente da concentração, com maiores diluições apresentando maior viabilidade celular.

A bioatividade de certos cimentos facilita a reabilitação e o tratamento de áreas ou raízes dentárias perfuradas, que antes eram consideradas irrecuperáveis devido a infecções persistentes [5,56,57]. As propriedades osteoindutoras desses cimentos biocerâmicos reparadores, como o PBS-HP, e sua resistência à umidade sugerem seu uso até mesmo como material para enxertos sintéticos em cirurgias de instalação de implantes imediatos [58]. Esta bioatividade também é observada em cimentos à base de MTA, como demonstrado em um estudo de Abu Zeid et al. (2017) [59], onde NeoMTA Plus e MTA branco foram submetidos a testes de bioatividade e analisados por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e difração de raios X (XRD). Os resultados mostraram que ambos os cimentos são bioativos, mas o NeoMTA Plus, por ter um tempo de presa mais rápido, apresentou um desempenho superior, sendo uma alternativa ao MTA branco no tratamento cirúrgico endodôntico.

Pesquisas que comparam diferentes tipos de cimentos, sejam eles à base de MTA, biocerâmicos ou resinosos, estão se tornando mais comuns. A maioria dos resultados destaca a efetividade dos cimentos biocerâmicos em comparação com outros, especialmente em termos de biocompatibilidade, bioatividade e facilidade de manuseio, características essenciais para um cimento ideal [19]. Outras características, como adaptação marginal, adesão às paredes do canal radicular e baixa descoloração, reforçam a ideia de que os cimentos biocerâmicos são uma opção promissora para o tratamento de complicações endodônticas [60].

1.2.2 CIMENTOS BIOCERÂMICOS OBTURADORES

Como discutido anteriormente, o MTA é amplamente utilizado na endodontia devido à sua biocompatibilidade, sendo frequentemente recomendado para cirurgias apicais e selamento de perfurações radiculares, especialmente em sua forma pura [61]. A partir de suas propriedades biológicas, surgiram no mercado alguns cimentos obturadores à base de MTA, como o MTA Fillapex. A citotoxicidade desses materiais foi comparada a outros cimentos consagrados, como o AH Plus. Em um estudo realizado por Marins FC et al. (2017) [61], fibroblastos humanos da linhagem MRC-5 foram expostos aos

cimentos EndoSeal, MTA Fillapex e AH Plus, este último considerado padrão ouro. Os resultados mostraram que, embora ambos os cimentos à base de MTA tenham o MTA como componente principal, tanto o EndoSeal quanto o MTA Fillapex apresentaram níveis de citotoxicidade. Além disso, o AH Plus, usado como referência, demonstrou uma citotoxicidade significativamente menor em uma das quatro diluições testadas. Em outro estudo, as propriedades biológicas do MTA Fillapex e do MTA Plus foram avaliadas em cultura de células pulpares humanas, revelando que o MTA Plus manteve taxas adequadas de viabilidade celular em todas as diluições, enquanto o MTA Fillapex mostrou-se citotóxico em algumas concentrações [7,57].

Devido a esses resultados, que apontam para limitações dos cimentos à base de MTA, especialmente no que diz respeito à citotoxicidade, surgiu a necessidade de aprimoramento desses materiais. Um dos cimentos biocerâmicos obturadores com maior respaldo na literatura em relação às suas propriedades físico-químicas e biológicas é o Endosequence BC Sealer™. Entretanto, ainda são poucos os relatos de casos clínicos com acompanhamento a longo prazo. A composição do Endosequence BC Sealer™ inclui óxido de zircônia, silicato de cálcio, fosfato de cálcio monobásico, hidróxido de cálcio e agentes espessantes. Esse cimento possui um tempo de presa de aproximadamente 4 horas à temperatura ambiente e endurece apenas em contato com a umidade. Além disso, ele se une à dentina, promovendo a formação de hidroxiapatita [62]. A umidade proveniente dos túbulos dentinários é capaz de hidratar o cimento, iniciando seu endurecimento e resultando na formação de hidroxiapatita, o que gera uma ligação química à dentina. Outras propriedades, como capacidade de expansão e selamento, biocompatibilidade e ação antimicrobiana, tornam o Endosequence BC Sealer™ uma opção poderosa para a obturação dos canais radiculares [11,14].

Nos casos complexos de perfuração radicular, as propriedades dos cimentos biocerâmicos abriram a possibilidade de tratar e preencher essas perfurações com um material biocompatível, bioativo, estável dimensionalmente e com bom escoamento, sem a necessidade de intervenção cirúrgica [11,14]. Candeiro GT et al. (2015) [63] compararam as propriedades biológicas do Endosequence BC Sealer™ e do AH Plus™ em fibroblastos humanos (FMM1). As células foram expostas aos cimentos e a viabilidade celular foi medida através

do ensaio MTT em intervalos de 1, 3, 5 e 7 dias. Os resultados mostraram uma maior viabilidade celular nas amostras expostas ao Endosequence BC Sealer™. Esses achados são consistentes com os de Zhang W et al. (2009) [58], que avaliaram a citotoxicidade dos cimentos à base de silicato de cálcio e do AH Plus™ em fibroblastos de ratos (L929), revelando que o AH Plus™ foi significativamente mais citotóxico do que o IRoot SP e o MTA. No entanto, Loushine BA et al. (2011) [40] também investigaram a citotoxicidade dos cimentos Endosequence BC Sealer™ e AH Plus™ em células MC3T3-E1, utilizando o ensaio MTT. Os resultados variaram conforme o tempo de presa dos cimentos. Ambos foram citotóxicos nas primeiras 24 horas, mas o AH Plus diminuiu gradualmente sua citotoxicidade, tornando-se não citotóxico antes da terceira semana. Por outro lado, o Endosequence BC Sealer™ permaneceu moderadamente citotóxico após 6 semanas [64].

Em outro estudo, as propriedades do Endosequence BC Sealer™ foram comparadas ao AH Plus, mostrando que a radiopacidade do Endosequence BC Sealer™ foi inferior à do AH Plus, mas ambos estavam dentro dos limites das normas ISO. A liberação de íons cálcio pelo Endosequence BC Sealer™ foi significativamente maior do que pelo AH Plus, e o escoamento de ambos os cimentos não apresentou diferenças significativas. Esses resultados indicam que o Endosequence BC Sealer™ é uma excelente opção de cimento obturador, sendo capaz de alcançar regiões não instrumentadas ou de difícil acesso, além de liberar cálcio, o que favorece o reparo das áreas afetadas [65].

A presença de microrganismos nos canais radiculares e o biofilme extraradicular são responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção de lesões apicais. Um dos principais objetivos do tratamento endodôntico é remover esses microrganismos através do preparo químico e mecânico, criando um ambiente favorável para o reparo e impedindo a recolonização [65]. Nesse contexto, Bukhari S et al. (2019) [66] avaliaram o efeito antimicrobiano do Endosequence BC Sealer™ em comparação ao AH Plus em dentes unirradiculares extraídos e contaminados com *Enterococcus faecalis* por 8 semanas. Os cimentos foram aplicados nas paredes dos canais radiculares, e as amostras foram incubadas por 24 horas e 2 semanas. Os resultados mostraram que o Endosequence BC Sealer™ foi significativamente mais eficaz na eliminação do *E. faecalis* em comparação ao AH Plus. Resultados semelhantes foram encontrados por

Candeiro GT *et al.* (2015) [63], que, utilizando testes de difusão em ágar e contato direto, concluíram que tanto o Endosequence BC Sealer™ quanto o AH Plus possuem efeito antimicrobiano, variando conforme o tempo de exposição ao *E. faecalis*.

Estudo recente avaliou as propriedades biológicas do Endosequence, AH Plus resinoso e recém-lançado AH Plus biocerâmico. Foram avaliados o efeito antibacteriano contra *Enterococcus faecalis* e citotoxicidade usando o ensaio de viabilidade celular XTT. As células do ligamento periodontal expostas aos cimentos biocerâmicos apresentaram níveis de viabilidade superiores a 90%. Já o cimento AH Plus resinoso foi considerado citotóxico, com resultados inferiores a 30% [67]. Todos os cimentos foram considerado eficazes contra *e.faecalis*, a precipitação de hidróxido de cálcio durante a reação de presa dos à base de silicato de cálcio aumenta o pH, e contribuiu para a eficácia antimicrobiana juntamente com a liberação de cálcio [67].

Recentemente, diversas marcas de cimentos biocerâmicos à base de silicato de cálcio prontos para uso foram introduzidas no mercado. Esses cimentos são considerados de fácil aplicação nos canais radiculares e, ao absorverem umidade, formam hidróxido de cálcio, hidroxiapatita, e criam uma camada mineral infiltrada na parede dentinária durante o processo de presa. Testes de viabilidade celular foram realizados em fibroblastos do ligamento periodontal expostos aos cimentos AH Plus biocerâmico e Bio-C Sealer. As amostras foram avaliadas com 1, 2, 3 e 7 dias e apontaram como sendo biocompatíveis e mais vantajosos que os cimentos à base de resina epóxi em situações clínicas que requerem alta biocompatibilidade [68].

As propriedades biológicas dos cimentos biocerâmicos e à base de MTA foram demonstradas em diversos outros estudos. Sua utilização é recomendada em tratamentos endodônticos e cirúrgicos. No entanto, mais estudos, especialmente avaliações *in vivo* a longo prazo, são necessários para confirmar a real efetividade dos cimentos biocerâmicos, apesar de suas promissoras propriedades, já comprovadas pelo MTA.

1.3 OBJETIVOS

Geral:

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a biocompatibilidade e o potencial bioativo de cimentos obturadores e reparadores biocerâmicos em cultura de células osteoblásticas e pulpares humanas.

Específicos:

- Relatar por meio de uma revisão de literatura as propriedades físicas, químicas e biológicas do cimento biocerâmico obturador AH Plus® Bioceramic Sealer com apresentação de casos clínicos
- Investigar a biocompatibilidade dos cimentos biocerâmicos obturadores presentes no mercado, por meio de teste de atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais (MTT) em células osteoblásticas humanas Saos-2 e cultura primária de células pulpares.
- Comparar a liberação de íons cálcio dos cimento biocerâmico obturadores no meio de cultura.
- Comparar a proliferação celular de células tipo Saos-2 e células pulpares expostas aos cimentos biocerâmicos obturadores por meio do experimento de *Wound Healing*.
- Avaliar a atividade da enzima fosfatase alcalina, de forma comparativa, em células osteoblásticas e células pulpares expostas aos diferentes cimentos biocerâmicos obturadores.
- Avaliar o potencial de mineralização das células do tipo Saos-2 e células pulpares humanas quando expostas aos diferentes cimentos biocerâmicos obturadores.

- Avaliar o potencial de mineralização das células do tipo Saos-2 quando expostas aos cimentos biocerâmicos reparadores em células osteoblásticas humanas Saos-2.

1.4 REFERÊNCIAS

- 1- Balic A. Biology Explaining Tooth Repair and Regeneration: A Mini-Review. *Gerontology*. 2018;64(4):382-388.
- 2- Ahmed HMA, Neelakantan P, Dummer PMH. A new system for classifying accessory canal morphology. *Int Endod J*. 2018; 51(2):164-176.
- 3- Kakani KA, Veeramachaneni C, Majeti C, Tummala M, Khiyani I. A Review on Perforation Repair Materials. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2015; 9: 09-13.
- 4- Tomson RME, Polycarpou N, Tomson PL. Contemporary obturation of the rootcanal system. *Nat Publ Gr*. 2014; 216(6): 315-322.
- 5- Balasubramaniam R, Krishnan A, Jayakumar S. Restoring the dignity: Case reports of root perforation management. *International Journal of Applied Dental Sciences*. 2017; 3(3): 171-174.
- 6- Camilleri, J. Mineral trioxide aggregate: present and future developments. *Endodont Topics*. 2015; 32 (1), 31-46.
- 7- Mestieri LB, Gomes-Cornélio AL, Rodrigues EM, Salles LP, Bosso-Martelo R, Guerreiro Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Biocompatibility and bioactivity of calcium silicate- based endodontic sealers in human dental pulp cells. 2015; 23(5): 467-471.
- 8- Osorio, R.M., Hefti, A., Vertucci, F.J., Shawley, A.L. Cytotoxicity of endodontic materials. *J. Endod*. 1998;24 (2), 91-96.
- 9- Torabinejad M and Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review—part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod*, 2010; 36:190.
- 10-Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKennedy 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.
- 11-Koch K. Bioceramic technology a game changer in endodontic obturation. *Art of Dentistry*. 2011; 9: 164-173.
- 12-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.

- 13-Hench LL. Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc.* 1991;74(7):1487–1510.
- 14-Koch KA, Brave DG. Bioceramics, Part II: The clinician's viewpoint. *Dent Today.* 2012; 31:118-122.
- 15-Koch KA, Brave GD, Nasseh AA. Bioceramic technology: closing the endo-restorative circle, part 2. *Dent Today.* 2010; 29:98.
- 16-Hansen SW, Marshall JG, Sedgley CM. Comparison of Intracanal EndoSequence Root Repair Material and ProRoot MTA to Induce pH Changes in Simulated Root Resorption Defects over 4 Weeks in Matched Pairs of Human Teeth. *J Endod.* 2011; 37: 502-506.
- 17-Grossman L, Oliet S, Del Rio CE. *Endodontic Practice*, 11a ed. Philadelphia, Lea & Febiger. 1988.
- 18-Sequeira DB, Seabra CM, Palma PJ, Cardoso AL, Peça J, Santos JM. Effects of a New Bioceramic Material on Human Apical Papilla Cells. *J. Funct. Biomater.* 2018, 9, 74.
- 19-Lima NFF, dos Santos PRN, Pedrosa MS, Delboni MG. Cimentos biocerâmicos em endodontia: revisão de literatura. *Revista da Faculdade de Odontologia Universidade de Passo Fundo.* 2017; 22, 248-254.
- 20-Nasseh A. The rise of bioceramics. *Endodontic Practice.* 2009; 2:17-22.
- 21-Duarte MAH, Marciano MA, Vivian RR, Tanomaru Filho M, Tanomaru JMG, Camilleri J. Tricalcium silicate-based cements: properties and modifications. *Braz Oral Res* 2018;32.
- 22-Küçükkaya Eren S. Clinical applications of calcium silicate-based materials: a narrative review. *Aust Dent J.* 2023 Jun;68 Suppl 1:S96-S109.
- 23-Adamo HL, Buruiana R, Schertzer L, Boylan RJ. A comparison of MTA, super-EBA, composite and amalgam as root-end filling materials using a bacterial microleakage model. *Int Endod J.* 1999; 32:197.
- 24-Daoudi MF, Saunders WP. evaluation of furcal perforation repair using mineral trioxide aggregate or resin modified glass ionomer cement with and without the use of the operating microscope. *J Endod.* 2002; 28:512.
- 25-Zhang W, Li Z, Peng B. Ex vivo cytotoxicity of a new calcium silicate-based canal filling material. *Int Endod J.* 2010; 43: 769–74.
- 26-Hargreaves KM, Cohen S. *Caminhos da Polpa.* 10a Edição, 2011.

- 27-Mooney GC, North S. The current opinions and use of MTA for apical barrier formation of non-vital immature permanent incisors by consultants in paediatric dentistry in the UK. *Dent Traumatol.* 2008;24(1):65–69
- 28-Accorinte ML, Loguercio AD, Reis A, Carneiro E, Grande RH, Murata SS, et al. Response of human dental pulp capped with MTA and calcium hydroxide powder. *Oper Dent.* 2008;33(5):488–95.
- 29-Marciano, M.A., Duarte, M.A.H. & Camilleri, J. Dental discoloration caused by bismuth oxide in MTA in the presence of sodium hypochlorite. *Clin Oral Invest* 19, 2201–2209 (2015).
- 30-Wiltbank KB, Schwartz SA, Schindler WG. Effect of selected accelerants on the physical properties of mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J Endod* 2007;33:1235–1238.
- 31-Loushine BA, Bryan TE, Looney SW et al. Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. *J Endod.* 2011;37, 673–7.
- 32-Raghavendra SS, Jadhav GR, Gathani KM, Kotadia P. Bioceramics in endodontics - a review. *J Istanbul Univ Fac Dent.* 2017; 2:128-137.
- 33-Camilleri J. New Perspective Article: Is Mineral Trioxide Aggregate a bioceramic? -ODOVTOS- *Int. J. Dental Sc.* 2016; 18-1: 13-17.
- 34-Noetzel J, Ozer K, Reissbauer BH, Anil A, Rössler R, Neumann K, Kielbassa AM. Tissue responses to an experimental calcium phosphate cement and mineral trioxide aggregate as materials for furcation perforation repair: a histological study in dogs. *Clin Oral Investig.* 2006 Mar;10(1):77-83.
- 35-Abboud KM, Abu-Seida AM, Hassanien EE, Tawfik HM. Biocompatibility of NeoMTA Plus® versus MTA Angelus as delayed furcation perforation repair materials in a dog model. *BMC Oral Health.* 2021 Apr 13;21(1):192.
- 36-Kakani AK, Veeramachaneni C. Sealing ability of three different root repair materials for furcation perforation repair: an *in vitro* study. *J Conserv Dent* 2020;23:62–65.
- 37-Yalniz H, Ziraman FG, Oncu A, Celikten B. Porosity analysis of four bioceramic materials used for the repair of furcation perforations via micro-computed tomography. *Dent Med Probl.* 2024 Jan-Feb;61(1):71-76.

- 38-Abdelmotelb, M.A., Gomaa, Y.F., Khattab, N.M.A. et al. Premixed bioceramics versus mineral trioxide aggregate in furcal perforation repair of primary molars: *in vitro* and *in vivo* study. Clin Oral Invest 25, 4915–4925 (2021).
- 39-Souza NJ, Justo GZ, Oliveira CR, Haun M, Bincoletto C. Cytotoxicity of materials used in perforation repair tested using the V79 fibroblast cell line and the granulocyte-macrophage progenitor cells. Int. Endod. J. 2006;39 (1), 40–47.
- 40-Haddad AAL, Aziz ZAC. Bioceramic-Based root canal sealers: A review. International Journal of Biomaterials. 2016: 1-10.
- 41-Faraoni G, Finger MS, Masson MC, Vlictorino FR. Avaliação comparativa do escoamento e tempo de presa do cimento MTA Fillapex® RFO. 2013; 18:180.
- 42-Patel S, Saberi N, Pimental T, Teng PH. Present status and future directions: Root resorption. Int Endod J. 2022 Oct;55 Suppl 4(Suppl 4):892-921. doi: 10.1111/iej.13715. Epub 2022 Mar 30.
- 43-Tek V, Türker SA. A micro-computed tomography evaluation of voids using calcium silicate-based materials in teeth with simulated internal root resorption. Restor Dent Endod. 2019 Nov 29;45(1).
- 44-Arıcan B, Sesen Uslu Y, Sarıalioğlu GA. Resistance to fracture of simulated external cervical resorption cavities repaired with different materials. Aust Endod J. 2023;49(1):174-182.
- 45-Rodríguez-Lozano FJ, López-García S, García-Bernal D, Pecci-Lloret MR, Guerrero-Gironés J, Pecci-Lloret MP, Lozano A, Llena C, Spagnuolo G, Forner L. *In vitro* effect of putty calcium silicate materials on human periodontal ligament stem cells. Applied Sci. 2020;10:325.
- 46-AlAttas MH, Edrees HY, Mohsin SF, Javed MQ. Recurrence of Invasive Cervical Resorption after six years of Nonsurgical and Surgical management by Bioceramic-Material. Pak J Med Sci. 2023 May-Jun;39(3):908-912.
- 47-Wilkinson KL, Beeson TJ, Kirkpatrick TC. Fracture resistance of simulated immature teeth filled with resilon, gutta-percha, or composite. J Endod. 2007;33:480–3.

- 48-Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dent Traumatol.* 2002;18:134–7.
- 49-Çiçek E, Yılmaz N, Koçak MM, Sağlam BC, Koçak S, Bilgin B. Effect of mineral trioxide aggregate apical plug thickness on fracture resistance of immature teeth. *J Endod.* 2017;43:1697–700.
- 50-Schwartz RS, Mauger M, Clement DJ, Walker WA., 3rd Mineral trioxide aggregate: A new material for endodontics. *J Am Dent Assoc.* 1999;130:967–75.
- 51-Grech L, Mallia B, Camilleri J. Characterization of set intermediate restorative material, biodentine, bioaggregate and a prototype calciumsilicate cement for use as root-end filling materials. *Int Endod J.* 2013;46:632–41.
- 52-Mohite P, Ramteke AD, Gupta R, Patil S, Gupta D. Comparative evaluation of mineral trioxide aggregate and biodentine apical plug thickness on fracture resistance of immature teeth: An *In vitro* study. *Ann Afr Med.* 2022 Jul-Sep;21(3):198-203.
- 53-Setzer FC, Shah SB, Kohli MR, Karabucak B, Kim S. Outcome of endodontic surgery: a meta-analysis of the literature part 1: comparison of traditional root-end surgery and endodontic microsurgery. *J Endod* 2010;36:1757–1765.
- 54-Saxena P, Gupta SK, Newaskar V. Biocompatibility of root-end filling materials: recent update. *Restor Dent Endod.* 2013;38:119–127.
- 55-Kim D, Lee H, Chung M, Kim S, Song M, Kim E. Effects of fast- and slow-setting calcium silicate-based root-end filling materials on the outcome of endodontic microsurgery: a retrospective study up to 6 years. *Clin Oral Investig* 2020;24:247–255).
- 56-Benetti F, Queiroz IOA, Cosme- Silva L, Conti LC, Oliveira SHP, Angelo Cintra LTA. Cytotoxicity, Biocompatibility and Biomineralization of a New Ready- for-Use Bioceramic Repair Material. *Brazilian Dental Journal.* 2019; 30(4): 325-332.
- 57-Gomes-Cornélio AL, Rodrigues EM, Salles LP, Mestieri LB, Faria G, Guerreiro-Tanomaru J M, Tanomaru-Filho M. Bioactivity of MTA Plus,

- Biodentine and an experimental calcium silicate-based cement on human osteoblast-like cells. *International Endodontic Journal*. 2015 1-9.
- 58- Zhang W, Li Z, Peng B. Assessment of a new root canal sealer's apical sealing ability. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009; 107(6): 79-82.
- 59-Abu Zeid ST, Alamoudi NM, Khafagi MG, Abou Neel EA. Chemistry and Bioactivity of NeoMTA Plus™ versus MTA Angelus® Root Repair Materials. *Journal of Spectroscopy*. 2017; 1–9.
- 60-Madhuri GV, Varri S, Bolla N, Mandava P, Akkala LS, Shaik J. Comparison of bond strength of different endodontic sealers to root dentin: an *in vitro* push-out test. *J Conserv Dent*. 2016; 19(5):461-4.
- 61-Marins FC, Ronconi CT, Saavedra FM, Lima ABM, Zaia AA, Moreira E JL, Silva EJNL. Avaliação da citotoxicidade de dois cimentos à base de MTA: um estudo *in vitro* *Rev. Bras. Odontol*. 2017; 74: 27.
- 62-Hess D, Solomon E, Spears R, He J. Retreatability of a bioceramic root canal sealing material. *J Endod*. 2011; 37: 1547.
- 63-Candeiro GT, 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*. 2015;49(9):858–864.
- 64-Loushine BA, Bryan TE, Looney SW et al. Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. *J Endod*. 2011;37, 673–7.
- 65-Candeiro GT, Correia FC, Duarte MA, 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: 842-845
- 66-Bukhari S e Karabucak B. The Antimicrobial Effect of Bioceramic Sealer on an 8-week Matured *Enterococcus faecalis* Biofilm Attached to Root Canal Dentinal Surface. *J Endod*. 2019;45(8):1047-1052.
- 67-Souza LC, Neves GST, Kirkpatrick T, Letra A, Silva R. Physicochemical and Biological Properties of AH Plus Bioceramic. *J Endod*. 2023 Jan;49(1):69-76.

68-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 Jul;49(7):871-879

CAPÍTULO 2

AH Plus Biocerâmico: O Novo Padrão Ouro em Cimentos Obturadores?

CAPÍTULO 2

2.1 INTRODUÇÃO

Os cimentos endodônticos são uma classe de material das mais críticas da terapia endodôntica. Esse tipo de material pode ser considerado permanente, pois é esperado que o cimento perdure no canal radicular por toda a vida do indivíduo. Conseqüentemente, determinadas propriedades são exigidas dos cimentos endodônticos obturadores, como selamento hermético do sistema de canais radiculares, radiopacidade, potencial antimicrobiano, biocompatibilidade e bioatividade. O desenvolvimento dos cimentos endodônticos passou por várias fases na busca de contemplar todos esses requisitos e alcançar o cimento ideal. A literatura da evolução dos cimentos endodônticos quando acompanhada desde a década de 80, relata a utilização de materiais como o óxido de zinco-eugenol (ZOE), quando a preocupação com o potencial antimicrobiano imperava; passando pela introdução dos cimentos à base de resina, atendendo à percepção da relevância do selamento hermético dos sistemas de canais radiculares; até os dias atuais, quando o cimento endodôntico deixa de ser “simplesmente inerte” e passa a ter potencial osteoindutor: Surgem os cimentos obturadores biocerâmicos. Dentre esses, o cimento endodôntico mais atual é o AH Plus Biocerâmico, com uma composição revolucionária e bem diversa dos seus antecessores.

Os primeiros cimentos utilizados na obturação de canais radiculares possuíam várias limitações, incluindo adesão insatisfatória às paredes do canal, solubilidade limitada e potencial toxicidade [1]. Na década de 80, os cimentos à base de resina epóxi marcaram um avanço significativo no campo da endodontia, pois esses cimentos apresentavam várias vantagens sobre os materiais tradicionais. Historicamente, podemos considerar o cimento AH 26 como o precursor dos cimentos AH Plus, que foi lançado em 1985 na prática endodôntica. O AH 26 era composto por uma resina epóxi e um endurecedor, proporcionando excelentes propriedades de vedação e estabilidade dimensional dentro do canal radicular [2]. A introdução do AH26 foi um marco na Endodontia e abriu caminho para o desenvolvimento de cimentos mais aprimorados, como o AH Plus. Em 2002, a Dentsply Maillefer lançou o AH Plus, como um sistema

de duas pastas, composto por resina epóxi, agente de presa e partículas de carga, que além de reduzir o tempo de endurecimento, proporcionam melhor adesão às paredes do canal radicular [3]. O cimento AH Plus tem várias vantagens em relação ao seu precursor, incluindo melhor fluidez, melhor adesão e melhor biocompatibilidade, maior tempo de trabalho. Entre os cimentos à base de resina, o AH Plus é um dos cimentos mais usados e confiáveis na prática endodôntica. Nos últimos anos, várias melhorias foram feitas no AH Plus para aprimorar ainda mais suas propriedades e desempenho. Uma dessas melhorias foi a introdução do AH Plus Jet, uma versão do AH Plus com facilidade de manuseio, tempo de presa mais rápido e melhor radiopacidade. Recentemente, o AH Plus sofreu adição de componentes bioativos em sua formulação, como o silicato de cálcio, uma mistura de Dióxido de Zircônio, Silicato Tricálcio, Dimetilsulfóxido (DMSO), Carbonato de Lítio e agentes espessantes [4]. O novo cimento foi batizado de AH Plus® Bioceramic Sealer.

Os cimentos endodônticos biocerâmicos se consolidaram na endodontia moderna diante da sua biocompatibilidade e bioatividade. O termo biocerâmico se refere a um tipo de material cuja composição é baseada em silicato de cálcio e com propriedades biológicas capazes de induzir respostas celulares [5]. Eles apresentam diversas vantagens em relação aos materiais convencionais, como maior resistência, biocompatibilidade e bioatividade, o que tem levado a uma crescente adoção pelos profissionais da área. Os cimentos obturadores a base de silicato de cálcio prometem induzir as células que ficam em contato direto com o material a um reparo tecidual mais rápido e eficiente [5]. Particularmente, o AH Plus biocerâmico (AHP-B) apresenta diversas propriedades que o tornam um candidato de primeira escolha para muitos procedimentos endodônticos. Ele é biocompatível, resistente à compressão e possui uma excelente capacidade de selamento apical, evitando a infiltração bacteriana e a perda de fluidos no canal radicular [4]. Além disso, o AHP-B possui excelentes propriedades físico-químicas, como boa adesão às paredes do canal, o que proporciona maior estabilidade mecânica [4]. Se apresenta como um cimento “pronto-para-uso” sem necessidade de manipulação. Adicionalmente, possui um tempo de presa adequado, permitindo a manipulação durante o procedimento sem que haja comprometimento do resultado. Sua radiopacidade facilita a visualização radiográfica após sua aplicação.

Neste trabalho, discutiremos em detalhes o cimento endodôntico AH Plus Biocerâmico, incluindo sua composição, propriedades, indicações e técnicas de aplicação. Além disso, abordaremos as pesquisas mais recentes sobre esses materiais e sua aplicabilidade clínica.

2.2 COMPOSIÇÃO DO CIMENTO ENDODÔNTICO BIOCERÂMICO

As propriedades e desempenho clínico dos cimentos endodônticos são diretamente determinadas pela sua composição. Os cimentos biocerâmicos são formulados usando uma combinação de vários componentes inorgânicos, como silicatos de cálcio, alumínio e ferro, além de óxido de zinco, vidro e sílica. Esses componentes são combinados para produzir um material com características únicas, como alta resistência mecânica e excelente biocompatibilidade. A primeira formulação biocerâmica a atrair grande atenção e aceitabilidade no universo da endodontia, especialmente devido às excelentes propriedades biológicas, foi o agregado de trióxido mineral ou MTA como cimento reparador.

Este, desde então, foi considerado o material de escolha para tratamento de perfurações, capeamentos diretos da polpa dentária, apicificação, e obturação retrógrada, entre outras indicações [6,7]. O MTA é composto por uma combinação de finas partículas de silicato tricálcio, tricálcio de alumínio, óxido tricálcio, óxido de bismuto e outros óxidos minerais constituindo o pó que endurece quando manipulado em água [7,8]. No entanto, a consistência fluida e elevado tempo de presa dificultam o seu uso clínico como material obturador de canais radiculares. Diferentes formulações deste cimento com aditivos e resinas foram propostos ao longo dos anos para aperfeiçoar a manipulação e consistência do cimento, dando origem a cimentos de silicato de cálcio modificados e cimentos de silicato de cálcio resinosos [8,9]. Os cimentos biocerâmicos são compostos principalmente por fosfato de cálcio, silicato tricálcico (Ca_3SiO_5) e silicato dicálcico (Ca_2SiO_4), alumina e zircônia, que lhe conferem propriedades superiores [9,10]. O cimento obturador mais novo dentro dessa classe de material é o AH Plus® Bioceramic Sealer, que foi introduzido recentemente no mercado em uma composição “pronta para uso” e com uma formulação inovadora.

O AH Plus® Bioceramic Sealer (AHP-B) tem uma proporção menor de silicatos do que outros biocerâmicos prontos para uso [4]. Diferente dos outros cimentos obturadores biocerâmicos, o AHP-B possui apenas silicatos tricálcicos associados a dimetil sulfóxido, carbonato de lítio e maior proporção do radiopacificador óxido de zircônia (50% a 70%) em sua formulação. Os silicatos de cálcio são os principais constituintes dos cimentos biocerâmicos e são considerados os principais responsáveis pela sua bioatividade e biocompatibilidade. Quando misturados com água, os silicatos de cálcio sofrem uma reação de hidratação, resultando na formação de gel de hidrato de silicato de cálcio. Este gel é responsável pela pega e endurecimento do cimento, proporcionando a necessária resistência e capacidade de vedação [10]. Quando da manipulação de cimento de silicato de cálcio incorporado com partículas de hidrogel, as partículas de hidrogel estimularam a formação de hidróxido de cálcio e hidrato de silicato de cálcio dentro do espaço vazio anteriormente ocupado por partículas intumescidas. Quando nanossílica foi adicionada ao hidrogel, os resultados foram superiores, sugerindo que a combinação de nano-sílica com partículas de hidrogel polimérico fornece um ambiente favorável para a reação pozolânica prosseguir e que a nano-sílica auxilia na reposição do espaço vazio do hidrogel com fases de cimento hidratadas [10]. Um outro estudo, demonstrou que os cimentos a base de silicatos de cálcio podem promover um ambiente altamente saturado com íons e sítios de nucleação de “Ca-Si hidrogel”. A supersaturação relativamente alta dá origem a uma montagem compacta e aleatória de cristais de hidroxiapatita, HAP [11]. O hidrato de silicato de cálcio é o principal subproduto da reação desses tipos de cimentos [12]. O Ca e o Si lixiviados do material dentário participaram do processo de nucleação dos cristais HAP, provavelmente por formação de sítios de nucleação de hidrogel Ca-Si [13]. A relação Ca/P observada na análise elementar dos cristalitos dos grupos do cimento de silicato de cálcio foi condizente com o estágio de maturação da apatita em que os íons carbonato podem substituir os íons fosfato ou íons hidroxila na estrutura da apatita [14]. Segundo os autores, duas possibilidades distintas poderiam explicar a alta relação Si/Ca nos cristalitos do grupo de células ósseas humanas expostas ao cimento de silicato de cálcio: a coprecipitação de silicato com apatita ou a substituição de fósforo por silício na rede de apatita de alguns cristalitos. A presença de silício oriundo do cimento de silicato de cálcio

dentro dos cristais de HAP aumenta o potencial bioativo do cimento endodôntico porque o silício é um elemento essencial para o crescimento normal do osso e dos tecidos conjuntivos [14]. Foi comprovado que o silício estimula a síntese de DNA, atividade de ALP, expressão de osteocalcina e proliferação de fibroblastos [15].

O dimetil sulfóxido (DMSO) é um solvente organossulfurado aprovado pela FDA, relatado por ter valor terapêutico na osteoartrite e na osteopenia. Um estudo mostrou que o DMSO pode aumentar a diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais e prevenir a perda óssea inibindo os osteoclastos [16]. Os efeitos do DMSO são dependentes da concentração, nas concentrações abaixo de 0,1% (14 mM), o DMSO foi ineficaz na inibição da osteoclastogênese, enquanto 1% (140 mM) de DMSO foi suficiente para inibir a diferenciação osteoclástica e função. A adição de RANKL, indutor de osteoclastogênese, aumentou a expressão genica de integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$, catepsina K e metaloproteinase 9 (MMP9), enquanto a adição de DMSO inibiu significativamente a expressão desses genes no dia 4 de exposição dos monócitos. O DMSO se opôs significativamente à ação do RANKL na proliferação e diferenciação das células precursoras dos osteoclastos. A catepsina K e a MMP9 são duas enzimas essenciais para as funções de reabsorção óssea dos osteoclastos. Um outro estudo com ratas ovariectomizadas demonstrou que injeções intraperitoneais de 0,5 a 2 ml de DMSO kg/dia inibiram a osteopenia induzida por deficiência de estrogênio, inibindo a função dos osteoclastos [17]. O DMSO administrado por via oral tem baixa toxicidade em humanos ($\text{LD}_{50} = 14,5 \text{ g/kg}$ de peso corporal). Além da propriedade inibidora de osteoclastos, o DMSO demonstrou aumentar a diferenciação de células pré-osteoblásticas murinas [18,19]. e a mineralização de osteoblastos primários de origem humana em concentrações de 0,35 a 1% [19]. Da mesma forma, células mesenquimais derivadas de tecido adiposo primário foram estimuladas por DMSO para produzir mais minerais, assim como células calvárias de camundongos, sugerindo que o aumento de DMSO é um fenômeno geral aplicável à cultura de osteoblastos. O DMSO facilitou aumentos na atividade e mineralização de ALP, e os aumentos foram mantidos ao longo da diferenciação celular. O DMSO induziu super-expressão de osterix, importante marcador de osteogênese, durante todo o período de mineralização.

O osterix endógeno foi significativamente elevado em 3 dias de tratamento com DMSO.

Outro componente interessante na composição do AHP-B é o lítio. Grupos de lítio e carbonato ocorrem naturalmente dentro da hidroxiapatita (HA) no tecido mineralizado do corpo humano [20]. O lítio pode reduzir a solubilidade do HA, aumentar a estabilidade térmica em comparação com outros cátions e aumentar a osteogênese. No estudo *in vivo*, o lado de compressão do osso alveolar durante a movimentação ortodôntica apresentou menos células osteoclasticas (células TRAP-positivas) no grupo de camundongos osteoporóticos tratados com cloreto de lítio (LiCl), indicando que esse composto pode inibir a reabsorção óssea [21]. O LiCl também demonstrou, além de reduzir a reabsorção radicular induzida ortodonticamente, promover a proliferação de cementoblastos e a diferenciação de células-tronco do ligamento periodontal [22]. O tratamento com LiCl em camundongos osteoporóticos aumentou a coloração de ALP na área de tensão durante a movimentação ortodôntica. Outros estudos *in vitro* mostraram que o LiCl pode regular a autofagia, importante mecanismo para a preservação da homeostase óssea, diminuindo a apoptose e reduzindo o dano celular [23]. O lítio também foi capaz de induzir o aumento da expressão genica de biomarcadores relacionados à osteogênese no modelo de osteoporose: *RUNX2*, *ALP*, *OPN* e *BMP2*, sugerindo que o LiCl não aumenta a osteogênese por meio de uma única via [21]. Após a administração de LiCl houve regulação positiva significativa da relação *OPG/RANKL*, indicando que o LiCl pode proteger contra a osteoclastogênese causada pela osteoporose através da via *RANKL/OPG*.

Os cimentos endodônticos trazem também em sua formulação agentes radiopacificadores para permitir sua identificação radiográfica. Radiopacificadores comumente usados nos cimentos biocerâmicos incluem óxido de bismuto, óxido de zircônio e óxido de tântalo. Nesse quesito, o AHP-B tem uma concentração significativa de óxido de zircônio. O óxido de zircônio, comumente conhecido como zircônia, é frequentemente adicionado aos cimentos biocerâmicos para melhorar suas propriedades mecânicas. As nanopartículas de zircônia aumentam a resistência à compressão e à flexão do cimento, tornando-o mais resistente à fratura e à deformação. A zircônia (ZrO_2), exibe excelentes propriedades, como baixa condutividade térmica, boa estabilidade térmica, boa resistência mecânica, boa tenacidade à fratura e alta

resistência ao choque térmico [24]. Ao longo dos anos, o ZrO_2 tem sido usado em catalisadores, sensores de oxigênio, células de combustível, materiais biológicos. Especialmente os nanomateriais de ZrO_2 têm sido empregados em aplicações médicas e ortopédicas, para reparo e substituição de partes do esqueleto humano. A capacidade antimicrobiana do ZrO_2 , ou a capacidade de sua superfície em reduzir o acúmulo de placa, é uma propriedade importante como alternativa aos implantes de titânio para melhorar a qualidade e o volume dos tecidos dentários [25]. O ZrO_2 tem sido amplamente usado em odontologia por sua biocompatibilidade, alta resistência, resistência à compressão e resistência a trincas. Estudos em culturas de células mostraram que a osseointegração observada na superfície otimizada de ZrO_2 é tão boa, ou melhor do que em outros materiais.

Além dos componentes bioativos principais, vários aditivos e modificadores podem ser incluídos em cimentos biocerâmicos para ajustar suas propriedades. Estes podem ser agentes aceleradores, retardadores, modificadores de viscosidade e agentes quelantes, entre outros. Em geral, esses aditivos ajudam a controlar o tempo de pega, a fluidez e as características de manuseio do cimento. As diferentes composições dos cimentos endodônticos explicam suas diferentes propriedades biológicas e físico-químicas.

2.3 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

Os diagnósticos endodônticos ditam as propriedades biológicas requeridas aos cimentos obturadores de canais radiculares. O tratamento endodôntico dos casos de polpa com vitalidade, como as pulpites, demandam um material obturador com potencial de induzir mineralização para o selamento natural do terço apical e dos remanescentes pulpares nos sistemas de canais inacessíveis aos instrumentos endodônticos. Se considerarmos os casos de necrose pulpar, especialmente aqueles com lesão apical, o potencial antimicrobiano do cimento endodôntico se destaca frente à infecção dos sistemas de canais radiculares, complementando a ação do preparo químico-mecânico. Nos casos de necrose, o potencial de induzir mineralização dos cimentos também pode ser considerada crucial para o reparo e formação óssea na região periapical.

O cimento AHP-B tem apresentado excelentes resultados nos estudos recentes que avaliaram suas propriedades biológicas. Células de ligamento periodontal expostas aos eluídos do AHP-B apresentaram viabilidade celular adequada nos tempos de 24, 48 e 72 horas de cultivo, semelhante ao grupo controle no ensaio de atividade mitocondrial [26]. Entretanto, as células tratadas diretamente com amostras do AHP-B exibiram uma atividade de desidrogenase mitocondrial significativamente menor do que o grupo controle [26] que pode estar relacionada com a bioatividade de cimento e não a uma citotoxicidade. Afinal, as hPDLSCs expostas ao AHP-B apresentaram morfologia normal e alta expressão de genes de mineralização. Após 3 e 7 dias de cultivo com o AHP-B, as células exibiram uma expressão precoce significativamente maior da enzima fosfatase alcalina (ALP) e do fator de transcrição 2 (RUNX2); e uma expressão tardia (14 e 21 dias de cultura) significativamente maior de amelogenina X (AMELX), ALP e sialoproteína óssea (BSP). As células expostas ao AHP-B também apresentaram alta expressão dos genes da proteína de fixação do cimento (CAP) e proteína do cimento 1 (CEMP1), que desempenham um papel importante na regeneração e reparação do periodonto. Quando expostas ao cimento AHP-B em meio osteogênico, as células exibiram uma formação de nódulos mineralizados significativa, corroborando a alta expressão dos genes de mineralização. Por outro lado, o cimento endodôntico precursor da versão biocerâmica, o AHP à base de resina epóxi, demonstrou citotoxicidade em células do ligamento periodontal humano (hPDLSCs). Após exposição à diferentes diluições do material as hPDLSCs apresentaram diminuição significativa na viabilidade e proliferação celular, além de alterações morfológicas morfologia e perda de adesão celular [26]. O componente resinoso dos cimentos endodônticos tem sido associado à citotoxicidade em diversos estudos [27,28].

Biocompatibilidade e bioatividade são propriedades relevantes que direcionam o cimento a ser a primeira escolha para os tratamentos endodônticos. A biocompatibilidade dos cimentos biocerâmicos é possivelmente uma consequência da capacidade do material em manter um pH básico no ambiente circundante e da liberação de íons cálcio [27]. Entretanto, outros componentes que são liberados dos cimentos biocerâmicos em contato ou adjacentes aos tecidos do paciente também podem contribuir para o processo de nucleação e

formação dos cristais de hidroxiapatita (HAP). Em um estudo com células osteoblasticas, o cimento a base de silicato de cálcio proporcionou um microambiente altamente saturado de íons e sítio de nucleação de hidrogel de Ca-Si, dando origem a um conjunto compacto e aleatório de cristais de HAP [13]. O Ca e o Si dispersados do cimento participaram no processo de nucleação dos cristais de HAP, promovendo mineralização. Os fortes picos de Ca, P e Si foram indicativos de deposição de fosfato de cálcio. O silício dispersado dos cimentos de silicato também pode substituir o fósforo na estrutura da apatita participando do processo de mineralização, aumentando o potencial bioativo deste material. O silício é um elemento essencial para o crescimento normal do tecido ósseo e tecidos conjuntivos, estimula a síntese de DNA, a atividade de ALP, a expressão de osteocalcina, e a proliferação de fibroblastos [14,15]. A alta concentração de cálcio e íons hidroxila que podem ser liberados do cimento biocerâmico pode modificar a biocompatibilidade e a bioatividade desse material. Um cimento à base de MTA mostrou modulação dupla em células da polpa dentária humana através de receptores de cálcio e pH alcalino. Células expostas ao biocerâmico demonstraram ativação em cascata da via CaSR-fosfolipase C, que desempenha papel essencial na diferenciação osteogênica, regulando a transcrição dos genes de mineralização da matriz óssea e dentinária [27].

Outra propriedade biológica dos cimentos endônticos de extrema importância é o potencial antibacteriano. As bactérias, fungos e vírus, diversos microrganismos, podem habitar o sistema de canais radiculares formando biofilmes aderentes à superfície. Alguns desses microrganismos podem apresentar alta resistência aos agentes antimicrobianos, persistindo após o preparo químico-mecânico. Os diversos cimentos biocerâmicos têm demonstrado diferentes potenciais de efeitos antimicrobianos. Em um estudo comparativo, o AHP-B e demais biocerâmicos capazes de promover um microambiente alcalino foram capazes de erradicar a bactéria *Enterococcus faecalis* [29]. O pH elevado promovido pelos cimentos biocerâmicos afeta a estrutura das células bacterianas, causa desnaturação das proteínas da membrana citoplasmática, peroxidação lipídica e inibição da replicação do DNA e atua como uma barreira física que restringe o crescimento microbiano, resultando na redução da viabilidade celular [30]. Segundo esses autores o biofilme de *Enterococcus faecalis* é susceptível a valores de pH superiores a

11,5. Os cimentos a base de silicato de cálcio têm exibido atividade também em outros tipos de biofilmes bacterianos, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Porphyromonas gingivalis* e *Candida albicans* [31]. Os cimentos à base de silicato de cálcio têm um forte efeito antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas, como o *E. faecalis*, junto com bactérias Gram-negativas *P. gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis* [31]. Alguns cimentos biocerâmicos possuem povidona, que não tem propriedades microbicidas, mas retarda a liberação de íons, mantendo assim a atividade antimicrobiana em longo prazo [31,32]. O óxido de zircônio danifica as membranas bacterianas e impede o crescimento adicional. Os componentes de óxido dos biocerâmicos danificam as paredes celulares de bactérias Gram-positivas e aumentam a permeabilidade das moléculas em seu citoplasma e facilitam a penetração do hidróxido de cálcio no citosol [32].

Importante, observar que o mecanismo antimicrobiano dos cimentos endodônticos biocerâmicos pode ser influenciado pela velocidade com liberam íons, especialmente cálcio e hidroxila. Essa lixiviação de íons resulta em um ambiente de pH básico, destruindo as estruturas celulares, DNA, inibindo atividades enzimáticas importantes para o metabolismo, crescimento e divisão das células microbianas.

2.4 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

As propriedades biológicas dos cimentos biocerâmicos são relatadas como uma das principais vantagens do seu uso clínico. Entretanto, o comportamento biológico deste material está diretamente relacionado às suas propriedades físicas, depende do completo preenchimento do conduto, da liberação de cálcio durante a presa e da sua estabilidade ao longo do tempo [12]. A composição “pronta para uso” dos cimentos biocerâmicos permite aplicação facilitada possibilitando atingir áreas não tocadas pelos instrumentos incluindo deltas apicais. Sua presa é iniciada com a presença de umidade no interior dos túbulos dentinários e o contato do silicato de cálcio com água promove a dissolução do hidróxido de cálcio correspondendo a um dos principais subprodutos dessa reação [33]. Essa solubilidade pode ser considerada uma desvantagem podendo comprometer o selamento hermético do sistema de

canais radiculares permitindo o fluxo de subprodutos bacterianos [26]. Entretanto, a presença apenas de silicato tricálcico e sulfóxido de dimetilo como carga é reportada como a grande diferença entre o cimento AHP-B e os outros cimentos da mesma categoria. A ausência de silicatos dicálcico resulta em uma menor proporção de silicatos em sua composição e esta associada a maior solubilidade [4]. Durante o período de 28 dias com 100% de umidade e a 37°C o cimento AHP-B apresentou solubilidade de aproximadamente 33% em soro fisiológico e 20% em água destilada. Essa solubilidade é medida principalmente nas primeiras 24h o que aponta para uma alta solubilidade durante a fase inicial de presa tornando-se relativamente estáveis após 28 dias [4]. Nesse período inicial de endurecimento a liberação de cálcio é alta e essencial para suas propriedades biológicas [4]. Em um estudo posterior, o AHP-B demonstrou alta solubilidade ($5,80 \pm 1,5$), além de apresentar maior volume de poros abertos e maior absorção de água em comparação com outros cimentos, como o Ceraseal ($1,02 \pm 0,43$) e o AH Plus resinoso ($0,80 \pm 0,12$). Esse comportamento pode comprometer a estabilidade do AHP-B *in vivo*, caso a nucleação de apatita e carbonato não compense a perda de substância ocorrida nesse ambiente [36]. A norma ISO 6876:2012 estabelece uma faixa para a solubilidade dos cimentos endodônticos, sendo comparada em um estudo com os resultados obtidos para o AHP-B. Os dados indicaram que a solubilidade do AHP-B (4,5%) excedeu o limite previsto pela referida norma que deve ser inferior <3% [37,38].

A liberação de cálcio e consequente manutenção do pH alcalino, principalmente durante o período de presa inicial dos cimentos a base de silicato de cálcio é considerado umas das principais vantagens dos cimentos biocerâmicos. O pH elevado é capaz de induzir a cicatrização e a mineralização da estrutura óssea alveolar apical [26]. O silicato tricálcico presente no AHP-B é o responsável pela liberação de hidróxido de cálcio e consequente elevação do pH durante o processo de endurecimento do material que pode durar algumas semanas. Quando comparado ao cimento a base de resina epóxi AH Plus (Dentsply) o AHP-B foi capaz de manter o pH acima de 12 nas primeiras 24h e acima de 9 após 28 dias, diferentemente do AH Plus resinoso que apresentou pH 8.7 nas primeiras 24h e 5.7 após 28 dias [4]. O hidróxido de cálcio liberado desempenha um papel significativo na eliminação de microrganismos remanescentes após o processo químico-mecânico. A presença constante de

hidróxido de cálcio na região inibe a atividade microbiana sendo benéfica para erradicação de microrganismos compensando a alta solubilidade inicial [34].

A facilidade de inserção dos cimentos “prontos para uso” no interior do conduto radicular é notória, porém, ainda é indicada a utilização de cones principais de guta percha associada ao cimento obturador. Para atingir maior efetividade da obturação, técnicas de plastificação da guta-percha são descritas na literatura, entretanto, a elevação da temperatura pode alterar algumas propriedades dos cimentos biocerâmicos principalmente na estabilidade dimensional [35]. Estudo recente aponta que o AHP-B não sofreu alteração em sua estrutura química em qualquer nível de tratamento térmico, assim como o tempo de presa e a sua espessura também não sofreram alterações significativas [4]. Além da consistência das propriedades físicas e dos espectros de FTIR em diversas faixas de temperatura, a detecção de carbonatos nos espectros de FTIR foi um indicativo da formação de hidróxido de cálcio, evidenciando que a reação de presa dos silicatos de cálcio não foi afetada pelo tratamento térmico. Além disso, as moléculas orgânicas presentes em todos os espectros de AHP-B indicam que os agentes espessantes orgânicos utilizados são capazes de resistir a estresses térmicos de curta duração [4].

Com o intuito de realizar a penetração nos túbulos dentinários e garantir a vedação de anatomias complexas, como istmos, canais secundários e deltas apicais, é necessário que o cimento apresente alta fluidez e espessura adequada. Essas características são essenciais para garantir um selamento eficiente e completo nessas regiões complexas. O AHP-B apresentou características de fluidez (2.38min) e espessura do filme (174 μ m) em conformidade com ISO 6876/2012 sendo indicado para uso em dentes com anatomia complexa [36,38]. Além de um bom escoamento, é importante visualizar radiograficamente a penetração do cimento no interior do sistema de canais radiculares. Os materiais à base de silicato de cálcio de primeira geração apresentavam certas limitações, que são principalmente atribuídas a baixa radiopacidade [39]. A norma ISO 6876/2012 orienta como radiopacidade satisfatória um resultado acima de 3.0 mmAl. Em estudo recente, o AHP-B apresentou 8.0 mmAl atribuído ao agente radiopacificador óxido de zircônio presente em 70% da sua composição [36,38].

A solubilidade e incorporação de água inerentes aos cimentos biocerâmicos foram maiores quando comparados aos cimentos a base de resina. a alta solubilidade pode comprometer significativamente as propriedades dos cimentos biocerâmicos, especialmente em relação à sua estabilidade a longo prazo no ambiente intraoral. Esses resultados ressaltam a importância de se monitorar e controlar a solubilidade dos cimentos biocerâmicos, a fim de garantir sua eficácia e longevidade quando utilizados em procedimentos endodônticos.

INDICAÇÕES (Segundo o fabricante)

Este produto é aplicável a todos os pacientes que necessitam de procedimentos de canal radicular em dentes da dentição permanente ou em dentes da dentição decídua quando não há sucessor permanente.

CONTRAINDICAÇÕES (Segundo o fabricante)

Indivíduos Sensíveis ao produtos

AVISOS E PRECAUÇÕES (Segundo o fabricante)

Advertências

- Não usar em pacientes alérgicos a qualquer um dos componentes do AH Plus® Bioceramic Sealer.
- Evitar o preenchimento excessivo: Ocorrendo um preenchimento excessivo com material de obturação, geralmente ele é muito bem tolerado pelo tecido circundante. Nos casos em que grandes quantidades de material são pressionadas para dentro do canal mandibular, seio maxilar ou cavidade nasal, geralmente é indicada a remoção imediata do material.

Precauções gerais (diretrizes e precauções importantes segundo o fabricante)

- A segurança e a eficácia do uso não foram definidas em mulheres grávidas, lactantes ou em crianças.
- Verifique o produto e a embalagem quanto a condições anormais ou danos antes do uso.
- Não use a não ser para a utilização prevista. Não use após a data de validade.

INSTRUÇÕES PASSO A PASSO (Segundo o fabricante)

- Antes de usar Determine o potencial de reação alérgica a qualquer um dos componentes de AH Plus® Bioceramic Sealer.
 - Desinfecte e seque o canal radicular após a conclusão da preparação do canal radicular.
 - Escolha o cone principal que possa ser inserido no comprimento de trabalho e se ajuste perfeitamente ao tamanho da preparação apical.
 - Remova e descarte a tampa cinza da seringa, extrudando uma pequena quantidade de selante, e descarte-o.
 - Coloque uma nova ponta de calibre 24 na seringa.
 - Verifique se o selante pode ser extrudado suavemente.
 - Insira a ponta de calibre 24 para não além do terço médio do canal radicular.
 - Injete o selante no canal radicular até que fique visível no orifício do canal radicular. Mantenha a ponta da agulha imersa no selante durante a injeção para evitar a inclusão de espaços vazios.
 - Insira o cone principal no canal radicular e empurre-o até o batente apical.
 - Evite pressão excessiva para minimizar ou prevenir a extrusão de materiais obturadores radiculares para além do forame apical.
 - Corte e remova a porção coronal do cone mestre no orifício do canal radicular. Compacte a parte coronal do cone com um plugue de tamanho apropriado e ajustado.
- Evite pressão excessiva para minimizar ou prevenir a extrusão de materiais obturadores radiculares para além do forame apical.
- Corte e remova a porção coronal do cone mestre no orifício do canal radicular.
- Compacte a parte coronal do cone com um plugue de tamanho apropriado e ajustado.
- Faça radiografias para verificação.

2.5 CASOS CLÍNICOS

2.5.1 Relato de Caso I: Tratamento Endodôntico de Incisivo Lateral (12)

Apresentação do Caso:

O paciente compareceu ao consultório odontológico com queixa de dor intensa e sensibilidade no incisivo lateral superior direito. Clinicamente apresentava ausência de vitalidade pulpar e sensibilidade à percussão vertical.

Exame Radiográfico:

A radiografia periapical apresentou área radiolúcida associada ao ápice radicular

Diagnóstico e plano de Tratamento:

Com base nos sinais clínicos e radiográficos, o diagnóstico foi de abscesso periapical agudo e necessidade de tratamento endodôntico

Procedimento Endodôntico:

O procedimento foi iniciado com anestesia infiltrativa com 1 tubete de Anestésico (Lidocaína 2% com Epinefrina 1: 100.000), seguido de isolamento absoluto com lençol de borracha. A abertura coronária foi realizada com o auxílio de uma broca diamantada esférica 1012 e refinada com a broca de ponta inativa 2082. O canal foi instrumentado com sistema *WaveOne Gold* (Dentsply). Foi feito preparo cervical com o instrumento *WaveOne Gold Large*(45) e em seguida o comprimento de trabalho foi determinado com localizador apical Propex Pixi® (Dentsply). O glidepath foi feito com o instrumento *WaveOne Glider Gold* e em seguida o conduto foi preparado com o instrumento *WaveOne Gold Large* no comprimento de trabalho. A irrigação dos canais foi feita com solução de hipoclorito de sódio 2,5% seguida de agitação com EDTA 17%. Após a secagem do canal, o conduto foi preenchido com pasta de Hidróxido de cálcio e protegido por uma esponja estéril. O dente foi restaurado provisoriamente com cimento de ionômero de vidro. Após 7 dias o paciente retornou assintomático e seguindo os passos descritos na primeira consulta o dente foi irrigado novamente com solução de hipoclorito de sódio 2,5%, seguido por EDTA 17% e neutralização com soro fisiológico. Após a aspiração e secagem, o conduto foi preenchido com cimento AH Plus Biocerâmico (Denstply) seguido por inserção do cone único de guta-percha *WaveOne Gold Large*. Foi realizada a limpeza da cavidade com

álcool 70% e o dente foi restaurado com resina composta. Após 7 meses o paciente retornou para preservação onde foi possível observar regressão radiográfica da lesão periapical.



2.5.2 Relato de Caso II: Tratamento Endodôntico de 1º Molar Superior (26)

Apresentação do Caso:

O paciente compareceu ao consultório odontológico com queixa de sensibilidade ao morder. Clinicamente apresentava ausência de vitalidade pulpar e presença de fístula na mucosa vestibular

Exame Radiográfico:

A radiografia periapical apresentou área radiolúcida associada às raízes e envolvendo a região de furca.

Diagnóstico e plano de Tratamento:

Com base nos sinais clínicos e radiográficos, o diagnóstico foi de abscesso periapical crônico e necessidade de tratamento endodôntico.

Procedimento Endodôntico:

O procedimento foi iniciado com anestesia infiltrativa com 1 tubete de Anestésico Lidocaína 2% com Epinefrina 1: 100.000, seguido de isolamento absoluto com lençol de borracha. A abertura coronária foi realizada com o auxílio

de uma broca diamantada esférica 1012 e refinada com a broca de ponta inativa 2082. Os canais foram instrumentados com sistema *WaveOne Gold* (Dentsply). Foi feito preparo cervical com o instrumento *WaveOne Gold Primary* (25) e em seguida o comprimento de trabalho foi determinado com localizador apical Propex Pixi® (Dentsply). O glidepath foi feito com o instrumento *WaveOne Glider Gold* e em seguida os condutos vestibulares foram preparados com o instrumento *WaveOne Gold Primary*. O conduto palatino foi preparado com instrumento *WaveOne Gold Large*. A irrigação dos canais foi feita com solução de hipoclorito de sódio 2,5% seguida de agitação com EDTA 17%. Após a secagem do canal, os condutos foram preenchidos com pasta de Hidróxido de cálcio e protegido por uma esponja estéril. O dente foi restaurado provisoriamente com cimento de ionômero de vidro. Após 15 dias o paciente retornou assintomático e sem sinal clínico de fístula. Seguiu-se com os passos descritos na primeira consulta e o dente foi irrigado novamente com solução de hipoclorito de sódio 2,5%, seguido por EDTA 17% e neutralização com soro fisiológico. Após a aspiração e secagem, o conduto foi preenchido com cimento AH Plus Biocerâmico (Dentsply) seguido por inserção do cone único de gutapercha *WaveOne Gold Primary* para os canais vestibulares e *Large* para o canal palatino. Foi realizada a limpeza da cavidade com álcool 70% e o dente foi restaurado com resina composta. Após 7 meses o paciente retornou para preservação onde foi possível observar regressão radiográfica da lesão periapical.



2.5.3 Relato de Caso III: Retratamento Endodôntico de 1º Molar Inferior (36)

Apresentação do Caso:

O paciente compareceu ao consultório odontológico com fratura da coroa metalocerâmica. Clinicamente apresentava ausência de vitalidade pulpar, leve sensibilidade à percussão e fístula na mucosa vestibular.

Exame Radiográfico:

A radiografia periapical apresentou área radiolúcida associada às raízes e envolvendo a furca.

Diagnóstico e plano de Tratamento:

Com base nos sinais clínicos e radiográficos, o diagnóstico foi de abscesso periapical crônico e necessidade de tratamento endodôntico.

Procedimento Endodôntico:

O procedimento foi iniciado com anestesia infiltrativa com 1 tubete de Anestésico Lidocaína 2% com Epinefrina 1: 100.000. O núcleo metálico fundido foi removido com o auxílio de insertos ultrassônicos. Seguiu-se com isolamento absoluto com lençol de borracha e desobturação dos condutos com instrumento *WaveOne Gold Primary* (Dentsply) com auxílio de solvente eucaliptol. Em seguida, determinou-se o comprimento de trabalho utilizando localizador apical Propex Pixi® (Dentsply). O glidepath foi realizado com o instrumento *WaveOne Glider Gold* e posteriormente o conduto foi preparado com o instrumento *WaveOne Gold Primary e Medium*. A irrigação dos canais foi feita com solução de hipoclorito de sódio 2,5% seguida de agitação com EDTA 17%. Após a secagem do canal, os condutos foram preenchidos com pasta de Hidróxido de cálcio e protegido por uma esponja estéril. O dente foi restaurado provisoriamente com cimento de ionômero de vidro. Após 12 dias o paciente retornou assintomático e sem sinal clínico de fístula. Seguiu-se com os passos descritos na primeira consulta e o dente foi irrigado novamente com solução de hipoclorito de sódio 2,5%, seguido por EDTA 17% e neutralização com soro fisiológico. Após a aspiração e secagem, o conduto foi preenchido com cimento AH Plus Biocerâmico (Dentsply) seguido por inserção do cone único de gutapercha *WaveOne Gold Medium*. Foi realizada a limpeza da cavidade com álcool 70% e o paciente foi encaminhada para reabilitação protética. Após 7 meses o

paciente retornou para preservação onde foi possível observar regressão radiográfica da lesão periapical.



2.6 CONCLUSÃO

Os cimentos endodônticos biocerâmicos são uma opção atraente para procedimentos endodônticos, devido às suas propriedades únicas e alta eficácia clínica. A utilização desses cimentos está em ascensão e é provável que se torne o material de escolha. O AH Plus biocerâmico preenche alguns requisitos biológicos de um material obturador. Porém, sua solubilidade e a baixa porcentagem de silicatos em sua composição comprometem seu desempenho clínico deixando dúvidas sobre sua utilização. Com melhorias e pesquisas contínuas, é provável que o uso de cimentos endodônticos continue evoluindo, levando a resultados ainda melhores para os pacientes. Vale ressaltar que o cimento AH-Plus biocerâmico teve sua comercialização interrompida para ajustes em sua formulação e propriedades, principalmente em relação à sua solubilidade.

2.7 REFERÊNCIAS

1. Shah N, Logani A, Mishra N, Kaur A. Biototoxicity of commonly used root canal sealers: A meta-analysis. *J Conserv Dent*. 2015;18(2):83.
2. De Moor RJ, De Boever JG. The sealing ability of a new epoxy resin-based root canal sealer. *J Endod*. 2000;34(6):776–9.
3. 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 Sep;42(9):785–93.

4. 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 Oct 19;15(20):7320.
5. 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*. 2019 Dec 9;12(24):4113.
6. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 1999 Mar;25(3):197–205.
7. 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 Apr;23(4):225–8.
8. Lee SJ, Chung J, Na HS, Park EJ, Jeon HJ, Kim HC. Characteristics of novel root-end filling material using epoxy resin and Portland cement. *Clin Oral Investig*. 2013 Apr;17(3):1009–15.
9. 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 Apr;23(4):225–8.
10. Krafcik MJ, Bose B, Erk KA. Synthesis and Characterization of Polymer-Silica Composite Hydrogel Particles and Influence of Hydrogel Composition on Cement Paste Microstructure. *Adv Civ Eng Mater*. 2017 Feb 1;7(4):20170144.
11. Jiang H, Liu XY. Principles of Mimicking and Engineering the Self-organized Structure of Hard Tissues. *J Biol Chem*. 2004 Oct;279(40):41286–93.
12. Camilleri J. Hydration Characteristics of Calcium Silicate Cements with Alternative Radiopacifiers Used as Root-end Filling Materials. *J Endod*. 2010 Mar;36(3):502–8.
13. Salles LP, Gomes-Cornélio AL, Guimarães FC, Herrera BS, Bao SN, Rossa-Junior C, et al. Mineral Trioxide Aggregate–based Endodontic Sealer Stimulates Hydroxyapatite Nucleation in Human Osteoblast-like Cell Culture. *J Endod*. 2012 Jul;38(7):971–6.
14. Reffitt DM, Ogston N, Jugdaohsingh R, Cheung HFJ, Evans BAJ, Thompson RPH, et al. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1

- synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells *in vitro*. *Bone*. 2003 Feb;32(2):127–35.
15. Hanasono MM, Lum J, Carroll LA, Mikulec AA, Koch RJ. The Effect of Silicone Gel on Basic Fibroblast Growth Factor Levels in Fibroblast Cell Culture. *Arch Facial Plast Surg*. 2004 Mar 1;6(2):88–93.
 16. Yang C, Madhu V, Thomas C, Yang X, Du X, Dighe AS, et al. Inhibition of differentiation and function of osteoclasts by dimethyl sulfoxide (DMSO). *Cell Tissue Res*. 2015 Dec;362(3):577–85.
 17. Tamjidipoor A, Tavafi M, Ahmadvand H. Effect of dimethyl sulfoxide on inhibition of post-ovariectomy osteopenia in rats. *Connect Tissue Res*. 2013 Nov;54(6):426–31.
 18. Cheung WMW, Ng WW, Kung AWC. Dimethyl sulfoxide as an inducer of differentiation in preosteoblast MC3T3-E1 cells. *FEBS Lett*. 2006 Jan 9;580(1):121–6.
 19. Stephens AS, Stephens SR, Hobbs C, Hutmacher DW, Bacic-Welsh D, Woodruff MA, et al. Myocyte Enhancer Factor 2C, an Osteoblast Transcription Factor Identified by Dimethyl Sulfoxide (DMSO)-enhanced Mineralization. *J Biol Chem*. 2011 Aug;286(34):30071–86.
 20. Hajji H, Le Gallet S, Saviot L, Ben Salem E, Millot N. Mechanosynthesis of carbonate and lithium co-substituted hydroxyfluorapatite. *Mater Res Bull*. 2022 Jun;150:111750.
 21. Huang L, Yin X, Chen J, Liu R, Xiao X, Hu Z, et al. Lithium chloride promotes osteogenesis and suppresses apoptosis during orthodontic tooth movement in osteoporotic model via regulating autophagy. *Bioact Mater*. 2021 Oct;6(10):3074–84.
 22. Wang C, Li Y, Yu K, Jiang Z, Wang Y, Yang G. HOXA10 inhibit the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells by regulating β -catenin localization and DKK1 expression. *Connect Tissue Res*. 2021 Jul 4;62(4):393–401.
 23. Kazemi H, Noori-Zadeh A, Darabi S, Rajaei F. Lithium prevents cell apoptosis through autophagy induction. *Bratisl Med J*. 2018;119(04):234–9.

24. Wang J, Yin W, He X, Wang Q, Guo M, Chen S. Good Biocompatibility and Sintering Properties of Zirconia Nanoparticles Synthesized via Vapor-phase Hydrolysis. *Sci Rep.* 2016 Oct 11;6(1):35020.
25. Lin H, Yin C, Mo A. Zirconia Based Dental Biomaterials: Structure, Mechanical Properties, Biocompatibility, Surface Modification, and Applications as Implant. *Front Dent Med.* 2021 Aug 3;2:689198.
26. 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 Oct;55(10):1066–80.
27. 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 Aug 18;11(1):16784.
28. BakiR EP, YiLdiRiM ZS, BakiR Ş, Ketani A. Are resin-containing pulp capping materials as reliable as traditional ones in terms of local and systemic biological effects? *Dent Mater J.* 2022 Jan 25;41(1):78–86.
29. Souza LCD, Neves GST, Kirkpatrick T, Letra A, Silva R. Physicochemical and Biological Properties of AH Plus Bioceramic. *J Endod.* 2023 Jan;49(1):69–76.
30. Stenhouse M, Zilm P, Ratnayake J, Cathro P. Investigation of the effect of rapid and slow external pH increases on *Enterococcus faecalis* biofilm grown on dentine. *Aust Dent J.* 2018 Jun;63(2):224–30.
31. Huang Y, Li X, Mandal P, Wu Y, Liu L, Gui H, et al. The *in vitro* antimicrobial activities of four endodontic sealers. *BMC Oral Health.* 2019 Dec;19(1):118.
32. Suwartini T, Santoso J, Widyarman A, Ratnasari D. Efficacy of bioceramic and calcium hydroxide-based root canal sealers against pathogenic endodontic biofilms: An *In vitro* study. *Contemp Clin Dent.* 2022;13(4):322.
33. Donnermeyer D., Bürklein S., Dammaschke T., Schäfer E. Endodontic Sealers Based on Calcium Silicates: A Systematic Review. *Odontology.* 2019;107:421–436.

34. Mohammadi Z., Dummer P.M.H. Properties and Applications of Calcium Hydroxide in Endodontics and Dental Traumatology. *Int. Endod. J.* 2011;44:697–730.
35. Donnermeyer D., Schäfer E., Bürklein S. Real-Time Intracanal Temperature Measurement During Different Obturation Techniques. *J. Endod.* 2018;44:1832–1836.
36. 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 Nov 11;23(22):13914.
37. Raman V, Camilleri J. Characterization and Assessment of Physical Properties of 3 Single Syringe Hydraulic Cement-based Sealers. *J Endod.* 2024 Mar;50(3):381-388. doi: 10.1016/j.joen.2024.01.001.
38. International standards Organisation. Dentistry–Root canal sealing materials. ISO 6876. 2012
39. Camilleri J., Gandolfi M.G. Evaluation of the radiopacity of calcium silicate cements containing different radiopacifiers. *Int. Endod. J.* 2010;43:21–30.

CAPÍTULO 3

ANÁLISE COMPARATIVA DA VIABILIDADE CELULAR, PROLIFERAÇÃO E POTENCIAL DE MINERALIZAÇÃO DE CÉLULAS PULPARES HUMANAS E OSTEoblásticas EXPOSTAS A DIFERENTES CIMENTOS ENDODÔNTICOS BIOCERÂMICOS

*Artigo publicado: "COMPARATIVE ANALYSIS OF VIABILITY, PROLIFERATION, AND MINERALIZATION POTENTIAL OF HUMAN PULP AND OSTEOBLASTIC CELLS EXPOSED TO DIFFERENT BIOCERAMIC ENDODONTIC SEALERS". *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2025.01.008>.

CAPÍTULO 3

Resumo

Na prática clínica, os materiais de obturação endodôntica permanecem em contato direto com diferentes tipos de células, podendo ser inertes, causar reações adversas ou estimular a mineralização. O presente estudo teve como objetivo comparar a viabilidade, proliferação e potencial de mineralização de células da polpa dental humana (hDPCs) e da linhagem celular osteoblástica (Saos-2) após exposição aos cimentos endodônticos AH Plus® Bioceramic (AHP-B), Bio-C® Sealer (BIO-C), NeoMTA Plus® (NEOMTA-P) e MTA-FILLAPEX® (MTA-F). Todos os cimentos biocerâmicos foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. Antes da exposição das células, foi medida a liberação de íons de cálcio (Ca^{2+}) dos materiais dentários no meio de cultura, uma vez que as vias de sinalização de Ca^{2+} podem controlar a proliferação, diferenciação e apoptose celular. Em seguida, hDPCs e Saos-2 foram expostas aos cimentos para o ensaio de MTT, avaliando a viabilidade celular, e para o ensaio de *Wound Healing*, avaliando a proliferação celular. Para investigar o potencial de mineralização, foi avaliada a atividade de fosfatase alcalina (ALP) e o depósito de cálcio por coloração com vermelho de alizarina. A análise estatística foi realizada usando Two-way ANOVA para os ensaios de liberação de cálcio e cicatrização, e One-Way ANOVA para os outros ensaios, com correção pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Os cimentos liberaram diferentes concentrações de cálcio em tempos variados. A viabilidade e proliferação das hDPCs foram baixas no grupo AHP-B após 24 horas de exposição (NEOMTA-PCT > AHP-B > MTA-F), diferentemente das células osteoblásticas (NEOMTA-PCT > BIO-C > MTA-F) e (proliferação: AHP-B > NEOMTA-P~CT > BIO-C > MTA-F). A atividade de ALP, um marcador inicial de osteogênese, foi maior nas hDPCs expostas ao NEOMTA-P, enquanto as células osteoblásticas apresentaram maior ALP quando expostas ao AHP-B. Considerando a mineralização como um marcador tardio de diferenciação, NEOMTA-P, AHP-B e BIO-C induziram maior formação de nódulos mineralizados em ambas as linhagens celulares. Os cimentos AHP-B, NEOMTA-P e BIO-C estimularam a osteogênese em hDPCs e células Saos-

2, com diferenças marcantes entre os grupos. O AHP-B mostrou uma estimulação precoce superior nas células osteoblásticas, enquanto as hDPCs foram mais responsivas ao NEOMTA-P.

Palavras-chave: Silicato de Cálcio, Materiais Odontológicos, Polpa Dental, Endodontia, Osteoblastos, Obturação de Canal Radicular

Abstract

In clinical practice, endodontic obturation materials remain in direct contact with different types of cells and may be inert, cause adverse reactions, or stimulate mineralization. The present study aimed to compare the viability, proliferation, and mineralization potential of human dental pulp cells (hDPCs) and osteoblasts cell line (Saos-2) after exposure to AH Plus® Bioceramic (AHP-B), Bio-C® Sealer (BIO-C), NeoMTA Plus® (NEOMTA-P), and MTA-FILLAPEX® endodontic sealers (MTA-F). All bioceramic sealers were prepared according to the manufacturer's instructions. Before exposing the cells, we measured the release of calcium ions (Ca^{2+}) from the dental materials to the culture media once Ca^{2+} signaling pathways can control cell proliferation, differentiation, and apoptosis. After that, hDPCs and Saos-2 were exposed to the sealers for MTT assay to assess the cell viability and wound healing assay to evaluate the cell proliferation. To investigate the potential of mineralization, we assessed the alkaline phosphatase activity and calcium deposition by Alizarin red staining. Statistical analysis was performed using Two-way ANOVA for calcium release and wound healing assays and One-way ANOVA for other assays, with post-test Bonferroni correction. The results were significant when $p < 0.05$. The sealers released diverse concentrations of calcium at different times. The hDPCs viability and proliferation were low in the AHP-B group at 24h of exposure (NEOMTA-P~BIO-C~CT>AHP-B>MTA-F), distinct from the osteoblastic cells (NEOMTA-P~AHP-B~CT>BIO-C>MTA-F) and (proliferation: AHP-B>NEOMTA-P~CT>BIO-C>MTA-F). The ALP activity, an early marker of osteogenesis, was higher in hDPCs exposed to NEOMTA-P, while the osteoblastic cells showed higher ALP when exposed to AHP-B. Considering mineralization as a late marker of differentiation, NEOMTA-P, AHP-B, and BIO-C induced higher formation of mineralized nodules in both hDPCs and Saos-2. The AHP-B, NEOMTA-P, and BIO-C stimulated osteogenesis in hDPCs and Saos-2 cells, with marked differences between groups. AHP-B showed an improved early stimulation of osteoblastic cells, while hDPCs were more responsive to NEOMTA-P.

Key Words: Calcium Silicate, Dental Materials, Dental Pulp, Endodontics, Osteoblasts, Root Canal Obturation.

3.1 INTRODUÇÃO

Os cimentos endodônticos desempenham um papel crucial no sucesso da terapia endodôntica ao proporcionar uma vedação eficaz entre o material de obturação do canal radicular e as paredes do canal, prevenindo a infiltração bacteriana e promovendo a cicatrização dos tecidos circundantes [1]. Esses materiais devem garantir propriedades biológicas e mecânicas, como biocompatibilidade, adaptabilidade às irregularidades do canal e estabilidade dimensional [1]. O cimento ideal deve promover a regeneração tecidual e minimizar reações adversas quando em contato com os tecidos periapicais [2].

Um material endodôntico reconhecido por suas impressionantes propriedades biológicas é o agregado de trióxido mineral (MTA), composto por silicatos de cálcio. Ao longo dos anos, a excelência do MTA na reparação tecidual estimulou o desenvolvimento de cimentos para canais radiculares com silicatos de cálcio como principal componente [3]. A melhoria na composição dos cimentos, incluindo nanopartículas de silicato dicálcico e tricálcico, agentes radiopacificadores mais biocompatíveis, como óxido de zircônio, e a eliminação de metais pesados culminou nas gerações mais recentes de cimentos endodônticos [4]. Devido às suas excelentes propriedades biológicas, essa classe de materiais foi denominada biocerâmicos [3].

Um cimento biocerâmico é composto principalmente por fosfato de cálcio, silicato de cálcio, cerâmicas vítreas, alumínio e zircônia, que contribuem para propriedades superiores, como biocompatibilidade e potencial osteogênico [4.5.6]. Atualmente, estão disponíveis diversos cimentos para canais radiculares à base de silicato de cálcio. Um dos mais recentes é o AH Plus Biocerâmico (AHP-B), cuja composição é diferente de outros biocerâmicos comumente utilizados. Diferentemente de seus concorrentes, o AHP-B contém menos silicatos do que outros biocerâmicos prontos para uso, como o Bio-C Sealer (BIO-C) e o NeoMTA Plus (NEOMTA-P) [7]. Além disso, o AH Plus Biocerâmico contém apenas silicatos tricálcicos e inclui dimetilsulfóxido (DMSO) em sua formulação.

O DMSO, um solvente organossulfurado aprovado pela FDA, tem valor terapêutico relatado em casos de osteoartrite e osteopenia. Estudos mostraram que o DMSO pode aumentar a diferenciação osteoblástica de células-tronco

mesenquimais e prevenir a perda óssea ao inibir a atividade osteoclástica [8]. Outro componente curioso do AH Plus Biocerâmico é o carbonato de lítio. O lítio e os grupos carbonato ocorrem naturalmente na hidroxiapatita (HA) presente nos tecidos mineralizados do corpo humano [9]. O lítio pode reduzir a solubilidade da HA, aumentar sua estabilidade térmica em comparação com outros cátions e melhorar a resistência, osteogênese, bioatividade e dureza [10]. Contudo, altas concentrações de íons lítio no soro podem ser tóxicas [11], o que exige uma avaliação cuidadosa dos efeitos do lítio e do DMSO nas propriedades biológicas deste novo material [11].

Além disso, o AH Plus Biocerâmico contém uma proporção maior de óxido de zircônio como radiopacificador (50% a 70%), o que pode interferir em sua atividade biológica quando exposto aos tecidos periapicais [12]. Apesar do crescente interesse pelos cimentos biocerâmicos, a literatura comparando a biocompatibilidade e a bioatividade do AHP-B com outros cimentos biocerâmicos ainda é limitada. Um estudo demonstrou que o AH Plus Biocerâmico e o Endosequence BC induziram de forma semelhante a expressão gênica e a formação de nódulos calcificados em células-tronco do ligamento periodontal humano [13]. Contudo, mais estudos são necessários para avaliar de forma abrangente sua biocompatibilidade e potencial de mineralização.

Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar comparativamente a biocompatibilidade e o potencial de mineralização do AH Plus® Bioceramic Sealer (AHP-B) com o Bio-C® Sealer (Bio-C), o NeoMTA Plus® (NEOMTA-P) e o MTA-FILLAPEX (MTA-F) em culturas de células da polpa dental humana (hDPCs) e células osteoblásticas.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Isolamento e Cultura de Células de Polpa Dentária Humana (hDPCs)

O isolamento das células da polpa dentária humana (hDPCs) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília (nº 23852219.9.0000.0030) e conduzido de acordo com os princípios éticos da Declaração de Helsinque. Amostras de polpa foram coletadas de terceiros molares de pacientes com mais de 18 anos. Inicialmente,

o tecido foi colocado em uma placa de Petri contendo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 100 UI/mL de ampicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, para transporte ao laboratório (ALL SOLUTIONS GIBCO, GRAND ISLAND, NY).

O tecido foi lavado duas vezes em DPBS 1X, depois fragmentado e incubado em tripsina/EDTA (0,25%) por no máximo cinco minutos. O EDTA, um agente quelante, melhora a capacidade da tripsina de desprender células aderentes ao se ligar aos íons de cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}) da matriz extracelular, enfraquecendo a adesão célula-célula. Assim, as células migram facilmente do fragmento de tecido para o fundo dos poços como um explante. As placas de cultura são feitas de poliestireno tratado para cultivo celular, e a superfície do fundo dos poços é tratada (Nunclon Delta). Os frascos T-75 têm o mesmo tratamento, o que apoia o crescimento e a adesão ideal das células à superfície de cultivo.

Os fragmentos de tecido foram transferidos para tubos Eppendorf com meio de cultura e centrifugados a 4000 rpm por 3 minutos. Após a centrifugação, os pellets dos fragmentos de tecido foram suspensos em meio fresco, e o sedimento foi distribuído em placas de 12 poços com DMEM e incubado a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO_2 [14]. Quando as células atingiram confluência, foram desprendidas usando tripsina/EDTA, transferidas para frascos T-25 e subcultivadas nas condições descritas. Após atingir confluência novamente, as células foram desprendidas mais uma vez com tripsina/EDTA e mantidas em frascos T-75 (ALL PLATES AND FLASKS, CORNING, UNION CITY, CA). Para os experimentos, as células foram semeadas a uma densidade de 2×10^4 células por poço em placas de 12 poços (Corning, Union City, CA) e incubadas sob as mesmas condições descritas acima.

3.2.2 Cultura de Saos-2

Células osteoblásticas humanas (Saos-2, ATCC HTB-85) foram cultivadas como monocamadas em frascos T-75 (CORNING, UNION CITY, CA) contendo DMEM a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO_2 . As células aderidas foram desprendidas com tripsina/EDTA (0,25%) a 37°C por 2 minutos. As células coletadas foram colocadas em placas de 12 poços (CORNING, UNION CITY,

CA) a uma densidade de 2×10^4 células/poço e incubadas sob as mesmas condições descritas, por 24 horas, antes da exposição aos materiais [15].

3.2.3 Preparação dos Cimentos

Os cimentos AHP-B, BIO-C, NEOMTA-P e MTA-F foram preparados de acordo com as recomendações dos fabricantes. O nome comercial, composição, tempo de presa e porcentagem de conteúdo de silicato de cálcio de cada cimento estão resumidos na Tabela 1. Os cimentos foram misturados e colocados em moldes de polipropileno (3x5 mm) para a preparação das amostras. Os moldes foram incubados a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂ por 72 horas para permitir o endurecimento completo dos materiais. Após o período de presa, as amostras de cimento endurecido foram cuidadosamente transferidas para dispositivos transwell contendo membranas permeáveis de 0,4 µm (CORNING, UNION CITY, CA). Esses dispositivos foram usados para expor as amostras às células Saos-2 (linhagem osteoblástica) e às células da polpa dentária humana (hDPCs) nos respectivos experimentos.

Tabela 1 - Nome comercial, composição, apresentação, fabricante, tempo de presa e porcentagem de silicatos

Nome comercial	Composição	Apresentação	Fabricante	Tempo de presa % de silicatos
AH Plus@Selador Biocerâmico	Dióxido de zircônio, Silicato tricálcico, Dimetilsulfóxido, Carbonato de lítio, Agente espessante	"Pronto para uso"	Dentsply Sirona, Charlotte, EUA	120 minutos 15% ¹³
Selante Bio-C®	Silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio, óxido de zircônio, óxido de silício, polietilenoglicol e óxido de ferro*	"Pronto para uso"	Ângelus Londrina, PR, Brasil	240 minutos 65%*
NeoMTAPlus®	Pó: Silicato tricálcico, silicato dicálcico, óxido de tântalo, aluminato tricálcico, sulfato de cálcio. Líquido: Gel à base de água e agentes	pó e gel	Avalon Biomédica Houston, Texas, EUA	130 minutos 72%*

	espessantes e polímeros solúveis em água*			
MTA-FILLAPEX	colar A: resina de salicilato, tungstato de cálcio, sílica pirogênica. colar B: Sílica pirogênica, dióxido de titânio, agregado de trióxido mineral e base de resina	Pasta-Pasta	Angelus Londrina, PR, Brasil	100 minutos 13%*

* Informações do fabricante

3.2.4 Medição de íons de cálcio (Ca²⁺)

Após um período de 72 horas de presa, as amostras dos cimentos foram incubadas em placas de 12 poços (Corning) contendo 1,5 mL de DMEM, mantidas em condições controladas a 37 °C, com 95% de umidade e 5% de CO₂. A concentração de cálcio no meio foi determinada em partes por milhão (ppm) utilizando o medidor de cálcio portátil LAQUAtwin Ca-11 (HORIBA, São Paulo, SP, Brasil). Para a análise, foram coletados 500 µL do meio de cada poço e inseridos no equipamento para medições em intervalos de 1, 3, 24, 72 e 96 horas. Cada medição e calibração do dispositivo seguiram rigorosamente as orientações fornecidas pelo fabricante, garantindo a precisão e a confiabilidade dos dados obtidos. Para assegurar a consistência dos resultados, o experimento foi repetido de forma independente três vezes (n=9 por grupo).

3.2.5 Ensaio MTT

Após a exposição de 24 horas a cada um dos materiais, o meio de cultura foi substituído por DMEM contendo 0,55 mg/mL de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Sigma Chemicals, St. Louis, MO, EUA) sem soro fetal bovino (FBS). As placas foram reincubadas por quatro horas adicionais para permitir a formação de cristais de formazan. Após esse período, os cristais foram solubilizados em 500 µL de isopropanol acidificado (solução de HCl: isopropanol a 0,04N), e 100 µL das soluções resultantes foram transferidos para uma placa de 96 poços (Corning). A densidade óptica foi medida a 570 nm utilizando um leitor de placas ELx800 (Biotek Instruments, Winooski, VT). O experimento foi realizado em triplicata, totalizando nove replicações por grupo (n=9/grupo)

3.2.6 Ensaio *Wound Healing*

Para a realização do ensaio, uma ferida de 500 μm de largura foi criada ao longo do fundo de cada poço de cultura celular, que apresentava cerca de 95% de confluência, utilizando uma ponta de pipeta P-10 estéril. Em seguida, os transwells contendo as amostras dos cimentos foram posicionados nas placas para exposição celular. A cada 24 horas, 30 campos foram fotografados por grupo ($n = 30/\text{grupo}$) utilizando um microscópio invertido Zeiss Axiovert 100 (Zeiss, 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).

3.2.7 Ensaio de Fosfatase Alcalina (ALP)

Após cinco dias de exposição, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS 1X) e imersas em 1 mL de lauril sulfato de sódio (1 mg/mL; SLS, Sigma Chemicals, St. Louis, MO) por 30 minutos em temperatura ambiente, sem agitação. Em seguida, alíquotas de 50 μL de cada amostra foram adicionadas aos componentes do kit de ALP conforme as instruções do fabricante (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). A absorbância foi medida a 590 nm utilizando o ELx800 (Biotek Instruments). O experimento foi repetido de forma independente três vezes ($n=9/\text{grupo}$). A atividade de ALP foi expressa em μmol de timolftaleína/min/L, normalizada pela densidade óptica (DO) de células viáveis medida a 570 nm.

3.2.8 Coloração com Vermelho Alizarina (ARS)

Após 15 dias de exposição, as monocamadas celulares foram lavadas três vezes com PBS 1X e fixadas em formaldeído a 10% (Sigma) por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação, as monocamadas foram lavadas duas vezes com água destilada (dH₂O) e, em seguida, foi adicionado 1 mL de solução de ARS a 2% (pH 4,1) por poço ($n=9/\text{grupo}$). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 20 minutos para permitir a coloração. Após a

incubação, os poços foram lavados cinco vezes com 2 mL de dH₂O. Os nódulos corados foram observados e fotografados microscopicamente (Zeiss Axiovert 100, Alemanha, Jena) com uma ampliação de 20x. O cálculo da área corada foi realizado de acordo com o protocolo do software ImageJ 1.45 (National Institutes of Health, NIH, EUA).

3.2.9 Análise Estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi realizado para avaliar a normalidade dos dados, que apresentaram distribuição normal para todas as variáveis. Os dados foram exportados para planilhas do Excel (OFFICE 2007, MICROSOFT CORPORATION, REDMOND, WA) e submetidos à análise estatística: análise de variância (One-Way ANOVA e Two-Way ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, com $p < 0,05$ considerado significativo. A análise de variância Two-Way ANOVA foi utilizada para avaliar os dados de liberação de cálcio e *Wound Healing*, considerando os níveis de “tempo de exposição” e “grupo de materiais” como variáveis independentes. Os demais resultados foram analisados por meio de OneWay-ANOVA. Os cálculos do tamanho da amostra foram estabelecidos utilizando as médias e a variância dentro do grupo, com base nos resultados de outros estudos [15,16] considerando um alfa de 5% e poder de 80%. Os estudos foram realizados utilizando o software STATA/IC 15.1 (STATA CORP, COLLEGE STATION, TX, EUA).

3.3 RESULTADOS

Liberação de íons de cálcio

Os resultados deste estudo demonstraram variações significativas na liberação de cálcio pelos diferentes cimentos biocerâmicos ao longo do tempo, refletindo suas propriedades bioquímicas distintas. Em uma hora de incubação, os grupos MTA-F, BIO-C e AHP-B apresentaram diminuição na concentração de cálcio no meio DMEM, com valores significativamente inferiores ao controle (CT), que registrou aproximadamente 97,3 ppm (Figura 1). Essa redução inicial sugere uma possível adsorção ou reação dos íons de cálcio com os componentes

desses cimentos. Em contraste, o grupo NEOMTA-P destacou-se por um aumento significativo na liberação de cálcio, atingindo aproximadamente 160,3 ppm após uma hora e 168,33 ppm após três horas. Essa característica é indicativa de uma alta solubilidade e potencial reativo do NEOMTA-P.

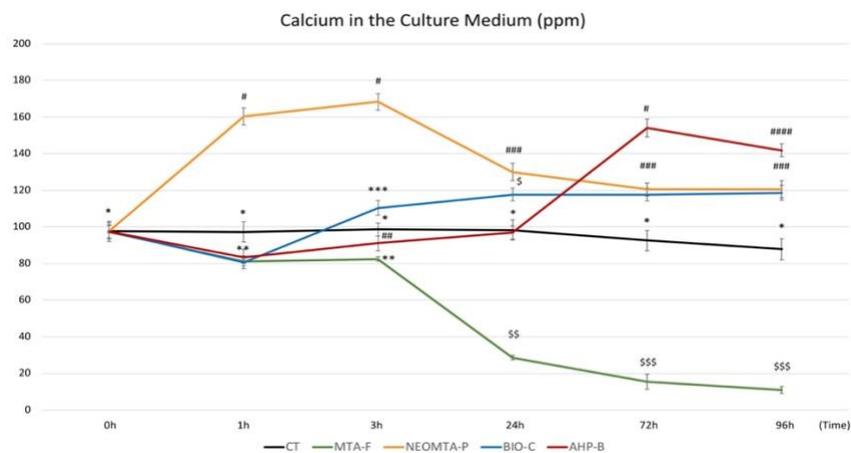


Figura 1 - Concentrações de cálcio (Ca^{2+} , ppm) no meio de cultura (DMEM) após incubação do cimento por 1, 3, 24, 72 e 96 horas. Em uma hora, os grupos MTA-F, BIO-C e AHP-B apresentaram diminuição significativa do cálcio no DMEM. Os grupos BIO-C e NEOMTA-P atingiram níveis semelhantes de concentração de cálcio às 72h. Ao mesmo tempo, o Ca^{2+} no AHP-B aumentou significativamente. Estatísticas: One-Way ANOVA e pos teste Bonferroni. Símbolos diferentes representam diferenças estatísticas entre grupos (média \pm DP, $p < 0,05$).

O cimento AHP-B apresentou uma diminuição na concentração de cálcio nas amostras após 72 horas de incubação, alcançando aproximadamente 154,00 ppm. Esse valor se manteve significativamente superior aos dos demais grupos durante as 96 horas de incubação, indicando um perfil de liberação de cálcio favorável ao longo do tempo. A hierarquia de liberação de cálcio observada foi AHP-B > NEOMTA-P ~ Bio-C > CT > MTA-F.

Os grupos BIO-C e NEOMTA-P, ao alcançarem concentrações de cálcio semelhantes às 72 horas (aproximadamente 117 ppm e 120 ppm, respectivamente), demonstraram resultados significativamente maiores em relação ao controle. Essa similaridade destaca os mecanismos de liberação e interação com o ambiente extracelular que favorecem a disponibilização de íons de cálcio (Tabela 2 e 3).

Por outro lado, o grupo MTA-F apresentou a menor liberação de cálcio ao longo do estudo, o que pode limitar seu potencial bioativo em comparação com os demais cimentos. Essa menor liberação de cálcio deve ser considerada ao

selecionar materiais para aplicações clínicas, especialmente em contextos que demandam uma resposta rápida de mineralização. Esses resultados ressaltam a importância de compreender as características de liberação de íons dos cimentos biocerâmicos, uma vez que essa liberação é um fator crítico na promoção da cicatrização e regeneração tecidual.

Tabela 2. Comparação das Concentrações de Cálcio (Ca²⁺, ppm) no Meio de Cultura Após a Incubação com os Cimentos

	0h ppm ± SD	1h/ ppm ± SD	3h ppm ± SD	24h ppm ± SD	72h ppm ± SD	96h ppm ± SD
CT	97.8 ±0,4923 ^{a,A*}	97.3 ±0,4923 ^{a,A*}	99.1 ±0,4923 ^{a,A*}	98.7 ±0,4923 ^{a,A*}	93.1 ±0,5149 ^{a,B*}	88.2 ±0,7177 ^{a,B*}
MTA-F	97.9 ±0,4923 ^{a,A*}	81.6 ±0,7177 ^{b,B*}	76.6 ±0,5222 ^{b,D*}	29.1 ±0,7784 ^{b,G*}	15.9 ±0,5222 ^{b,J*}	11.3 ±0,6030 ^{b,K*}
NEOMTA-P	98.0 ±0,4082 ^{a,A*}	160.3 ±0,5163 ^{c,C*}	168.3 ±1,0327 ^{c,C*}	130.1 ±0,6324 ^{c,H*}	120.5 ±0,8366 ^{c,I*}	120.9 ±0,5163 ^{c,I*}
BIO-C	98.1 ±0,5222 ^{a,A*}	81.1 ±0,4922 ^{b,B*}	110.7 ±0,9847 ^{d,E*}	118.2 ±0,4923 ^{d,I*}	118.1 ±0,4923 ^{c,I*}	119.2 ±0,9847 ^{c,I*}
AHP-B	97.9 ±0,5477 ^{a,A*}	83.6 ±1,0327 ^{b,B*}	92.2 ±1,1690 ^{c,F*}	97.6 ±1,2649 ^{a,A*}	154.1 ±4,0496 ^{d,C*}	141.6 ±1,9407 ^{d,L*}

Two-Way ANOVA						
Source of variation	SS	d.f.	MS	F	p-value	F crit
Factor #1 (material)	275.786,18399	5	55.157,23680	4.015,27602	0,00000	2,23684
Factor #2 (time)	14.220,41080	5	2.844,08216	207,04037	0,00000	2,23684
Factor #1 + #2 (material x time)	195.619,48000	25	7.824,77920	569,61969	0,00000	1,53401
Within groups	5.426,05500	395	13,73685			
Total	491.052,12979	430	1.141,98170			
Omega squared for combined effect	0,98794					

Tabela 3. Comparação das Concentrações de Cálcio Entre os Grupos Usando o Pós-teste de Bonferroni (P<0,05)

0h						
Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value	Significance
AHP-B vs BIO-C	-0,04167	-4,50817	4,42484	0,02754	1,00000	Not Significant
AHP-B vs CT	-0,15833	-4,62484	4,30817	0,10464	1,00000	Not Significant
AHP-B vs MTA-F	-0,05833	-4,52484	4,40817	0,03855	1,00000	Not Significant
AHP-B vs NEOMTA-P	-0,37500	-4,94189	4,19189	0,24239	1,00000	Not Significant
BIO-C vs CT	-0,11667	-4,58317	4,34984	0,07710	1,00000	Not Significant
BIO-C vs MTA-F	-0,01667	-4,48317	4,44984	0,01101	1,00000	Not Significant
BIO-C vs NEO	-0,33333	-4,90022	4,23356	0,21546	1,00000	Not Significant
CT vs MTA-F	0,10000	-4,36651	4,56651	0,06609	1,00000	Not Significant
CT vs NEOMTA-P	-0,21667	-4,78356	4,35022	0,14005	1,00000	Not Significant
MTA-F vs NEOMTA-P	-0,31667	-4,88356	4,25022	0,20468	1,00000	Not Significant

1h						
Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value	Significance
AHP-B vs BIO-C	2,48333	-1,98317	6,94984	1,64122	1,00000	Not Significant
AHP-B vs CT	-14,31667	-18,78317	-9,85016	9,46180	0,00000	Significant
AHP-B vs MTA-F	1,99167	-2,47484	6,45817	1,31628	1,00000	Not Significant
AHP-B vs NEOMTA-P	-77,19167	-81,65817	-72,72516	51,01554	0,00000	Significant
BIO-C vs CT	-16,80000	-21,26651	-12,33349	11,10303	0,00000	Significant
BIO-C vs MTA-F	-0,49167	-4,95817	3,97484	0,32494	1,00000	Not Significant
BIO-C vs NEO	-79,67500	-84,14151	-75,20849	52,65676	0,00000	Significant
CT vs MTA-F	16,30833	11,84183	20,77484	10,77809	0,00000	Significant

CT vs NEOMTA-P	-62,87500	-67,34151	-58,40849	41,55374	0,00000	Significant
MTA-F vs NEOMTA-P	-79,18333	-83,64984	-74,71683	52,33182	0,00000	Significant

3h

<i>Group vs. Group (Contrast)</i>	<i>Difference</i>	<i>95% Confidence Interval</i>		<i>Test Statistic</i>	<i>p-value</i>	<i>Significance</i>
AHP-B vs BIO-C	-19,50000	-23,96651	-15,03349	12,88744	0,00000	Significant
AHP-B vs CT	-7,88333	-12,34984	-3,41683	5,21005	4,42488E-6	Significant
AHP-B vs MTA-F	14,60000	10,13349	19,06651	9,64906	0,00000	Significant
AHP-B vs NEOMTA-P	-77,20833	-81,67484	-72,74183	51,02656	0,00000	Significant
BIO-C vs CT	11,61667	7,15016	16,08317	7,67739	1,68937E-12	Significant
BIO-C vs MTA-F	34,10000	29,63349	38,56651	22,53650	0,00000	Significant
BIO-C vs NEO	-57,70833	-62,17484	-53,24183	38,13911	0,00000	Significant
CT vs MTA-F	22,48333	18,01683	26,94984	14,85911	0,00000	Significant
CT vs NEOMTA-P	-69,32500	-73,79151	-64,85849	45,81650	0,00000	Significant
MTA-F vs NEOMTA-P	-91,80833	-96,27484	-87,34183	60,67561	0,00000	Significant

24h

<i>Group vs. Group (Contrast)</i>	<i>Difference</i>	<i>95% Confidence Interval</i>		<i>Test Statistic</i>	<i>p-value</i>	<i>Significance</i>
AHP-B vs BIO-C	-20,56667	-25,62507	-15,50826	13,59239	0,00000	Significant
AHP-B vs CT	-1,09167	-6,15007	3,96674	0,72148	1,00000	Not Significant
AHP-B vs MTA-F	68,46667	63,40826	73,52507	45,24924	0,00000	Significant
AHP-B vs NEOMTA-P	-32,54167	-37,60007	-27,48326	21,50661	0,00000	Significant
BIO-C vs CT	19,47500	14,41660	24,53340	12,87092	0,00000	Significant
BIO-C vs MTA-F	89,03333	83,97493	94,09174	58,84163	0,00000	Significant
BIO-C vs NEO	-11,97500	-17,03340	-6,91660	7,91421	0,00000	Significant
CT vs MTA-F	69,55833	64,49993	74,61674	45,97071	0,00000	Significant
CT vs NEOMTA-P	-31,45000	-36,50840	-26,39160	20,78513	0,00000	Significant
MTA-F vs NEOMTA-P	-101,00833	-106,06674	-95,94993	66,75584	0,00000	Significant

72h

<i>Group vs. Group (Contrast)</i>	<i>Difference</i>	<i>95% Confidence Interval</i>		<i>Test Statistic</i>	<i>p-value</i>	<i>Significance</i>
AHP-B vs BIO-C	35,98333	30,92493	41,04174	23,78118	0,00000	Significant
AHP-B vs CT	61,06667	56,00826	66,12507	40,35862	0,00000	Significant
AHP-B vs MTA-F	138,18333	133,12493	143,24174	91,32459	0,00000	Significant
AHP-B vs NEOMTA-P	33,49167	28,43326	38,55007	22,13446	0,00000	Significant
BIO-C vs CT	25,08333	20,61683	29,54984	16,57743	0,00000	Significant
BIO-C vs MTA-F	102,20000	97,73349	106,66651	67,54341	0,00000	Significant
BIO-C vs NEO	-2,49167	-6,95817	1,97484	1,64673	1,00000	Not Significant
CT vs MTA-F	77,11667	72,65016	81,58317	50,96597	0,00000	Significant
CT vs NEOMTA-P	-27,57500	-32,04151	-23,10849	18,22416	0,00000	Significant
MTA-F vs NEOMTA-P	-104,69167	-109,15817	-100,22516	69,19014	0,00000	Significant

96h

<i>Group vs. Group (Contrast)</i>	<i>Difference</i>	<i>95% Confidence Interval</i>		<i>Test Statistic</i>	<i>p-value</i>	<i>Significance</i>
AHP-B vs BIO-C	22,43333	17,96683	26,89984	14,82606	0,00000	Significant
AHP-B vs CT	53,41667	48,95016	57,88317	35,30278	0,00000	Significant
AHP-B vs MTA-F	130,25833	125,79183	134,72484	86,08700	0,00000	Significant
AHP-B vs NEOMTA-P	20,69167	16,22516	25,15817	13,67501	0,00000	Significant
BIO-C vs CT	30,98333	26,51683	35,44984	20,47671	0,00000	Significant
BIO-C vs MTA-F	107,82500	103,35849	112,29151	71,26094	0,00000	Significant
BIO-C vs NEO	-1,74167	-6,20817	2,72484	1,15106	1,00000	Not Significant
CT vs MTA-F	76,84167	72,37516	81,30817	50,78423	0,00000	Significant
CT vs NEOMTA-P	-32,72500	-37,19151	-28,25849	21,62777	0,00000	Significant
MTA-F vs NEOMTA-P	-109,56667	-114,03317	-105,10016	72,41200	0,00000	Significant

Viabilidade celular

Após 24 horas de exposição das hDPCs ao cimento AHP-B, observou-se uma taxa de viabilidade celular de aproximadamente 84,11%, o que foi significativamente inferior às taxas registradas nos grupos NEOMTA-P, BIO-C e controle (CT), que apresentaram taxas de viabilidade de cerca de 98,51%, 93,92% e 100,01%, respectivamente (Figura 2a). Por outro lado, as células

osteoblásticas Saos-2 expostas ao AHP-B demonstraram uma taxa de viabilidade de aproximadamente 97%, enquanto aquelas expostas ao NEOMTA-P apresentaram uma taxa de cerca de 90%. Ambos os resultados foram comparáveis à taxa de viabilidade do grupo controle, que foi de aproximadamente 102% (Figura 2b). Isso indica que, ao contrário das hDPCs, as células osteoblásticas mostraram uma resposta mais favorável ao AHP-B e ao NEOMTA-P. Além disso, a taxa de viabilidade das Saos-2 expostas ao BIO-C foi significativamente menor, com valores em torno de 78%. Em contraste, tanto as hDPCs quanto as Saos-2 expostas ao MTA-F apresentaram as menores taxas de viabilidade entre todos os grupos avaliados.

Proliferação celular

Após 24 horas de exposição das hDPCs ao cimento AHP-B, foi observado que aproximadamente 35% da área da ferida estava coberta por células. Em contraste, os grupos NEOMTA-P e BIO-C demonstraram uma taxa de proliferação celular semelhante à do controle (CT), que foi em torno de 80% (Figura 2c). Ao longo de 48 horas de exposição, a discrepância entre os grupos se manteve: o CT e o NEOMTA-P alcançaram uma taxa de fechamento de ferida próxima a 100%, enquanto o grupo BIO-C apresentou cerca de 95% de cobertura. Em contrapartida, o grupo AHP-B apenas atingiu cerca de 77%, evidenciando sua menor capacidade de promover a proliferação celular em comparação aos demais materiais. Em contraste, nas células osteoblásticas Saos-2, a porcentagem de área coberta após 24 horas de exposição ao AHP-B foi significativamente superior à observada nos grupos NEOMTA-P e BIO-C, apresentando aproximadamente 37,09%, 16,62% e 5,82%, respectivamente (Figura 2d). Após 48 horas, tanto o AHP-B quanto o NEOMTA-P mostraram percentuais de cobertura semelhantes, com valores em torno de 88,7% e 87,5%, respectivamente, enquanto o CT manteve a cobertura completa de 100%. No entanto, a taxa de cobertura celular no grupo BIO-C foi significativamente inferior, alcançando apenas 70%.

Adicionalmente, é importante ressaltar que, com exceção do grupo MTA-F, as células hDPCs e Saos-2 apresentaram uma morfologia confluyente e normal na área externa que delimitava a ferida, indicando uma resposta celular saudável

à exposição aos cimentos (Figura 2e). Essa observação sugere que, apesar das diferenças nas taxas de proliferação, os cimentos AHP-B, NEOMTA-P e BIO-C não induziram citotoxicidade aguda nas células em estudo.

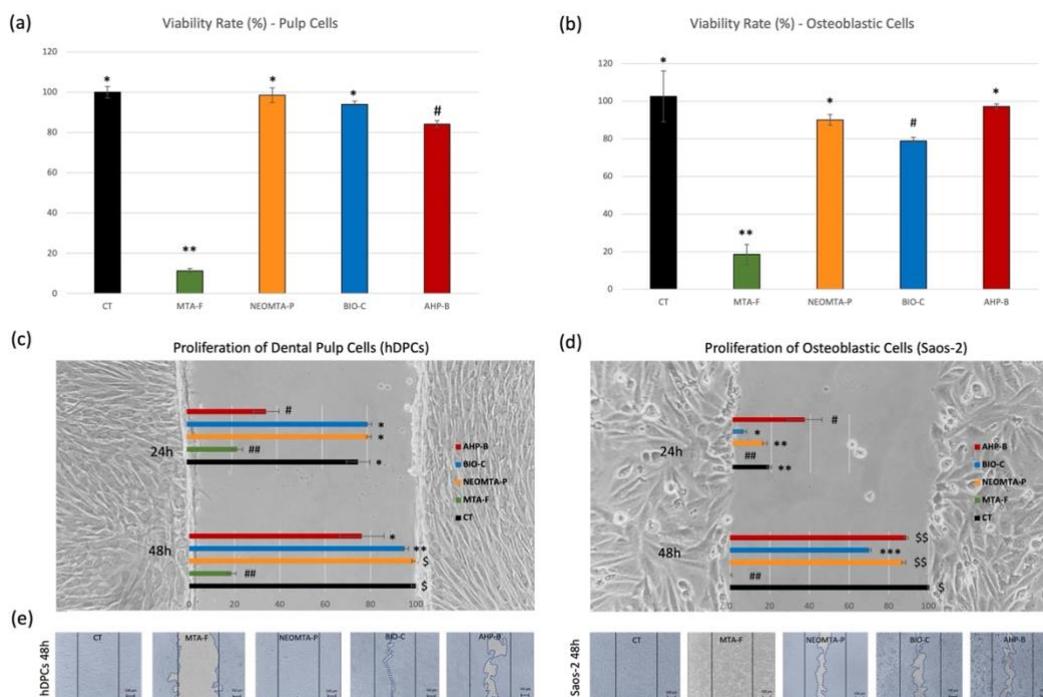


Figura 2 - Viabilidade celular e proliferação na ferida de hDPCs e Saos-2 expostos a NEOMTA-P, BIO-C, AHP-B e MTA-F. (a) A exposição de hDPCs por 24 horas ao AHP-B levou a uma taxa de viabilidade significativamente menor do que os grupos NEOMTA-P, BIO-C e CT. (b) Em Saos-2, a viabilidade após exposição ao AHP-B foi semelhante ao NEOMTA-P e CT (~100%), enquanto o grupo BIO-C apresentou uma taxa de viabilidade significativamente baixa (b). (c, d) Os hDPCs e Saos-2 apresentaram um padrão diferente de proliferação, que dependia do material e do tempo de exposição. hDPCs expostas ao AHP-B proliferaram, cobrindo apenas 35% da área da ferida em 24 horas (c); significativamente menor que NEOMTA-P, BIO-C e CT. Às 48 horas de exposição aos hDPCs, a área da ferida era ainda menor para o AHP-B; apenas NEOMTA-P e CT cobriram 100% da ferida (c). Pelo contrário, as células osteoblásticas expostas ao NEOMTA-P, BIO-C, CT e MTA-F apresentaram menores áreas cobertas às 24 horas do que o AHP-B (d). Às 48 horas, o fechamento total do espaço ocorreu apenas no grupo Saos-2 CT, embora as células tenham proliferado acentuadamente nos grupos AHP-B e NEOMTA-P (d). (e) Imagens microscópicas representativas do ensaio de feridas às 48 horas de exposição as hDPCs e Saos-2 aos selantes. Apesar da proliferação diversificada, as células dos grupos AHP-B, NEOMTA-P e BIO-C foram fixadas e apresentaram morfologia atual (barras de escala de 100 μ m) (e). No entanto, a maioria das células expostas ao MTA-F se desprendeu e apresentou formas anormais (e). Estatísticas: One-way ANOVA e pós-teste Bonferroni avaliaram os dados de viabilidade celular. Two-way ANOVA seguida de pós-teste Bonferroni para avaliar a

proliferação. Ambos os fatores, materiais e tempo de exposição, foram significativos. Símbolos diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos (média \pm DP, $p < 0,05$).

Atividade de Fosfatase Alcalina

A atividade da fosfatase alcalina (ALP) nas hDPCs expostas ao NEOMTA-P (~153,2 timolftaleína/min/L/OD) foi a mais alta, seguida por AHP-B (~135,7 timolftaleína/min/L/OD) e BIO-C (~134,2 timolftaleína/min/L/OD), que foram estatisticamente semelhantes (Figura 3a). Todos os grupos de hDPCs apresentaram atividade de ALP significativamente mais alta em comparação com o grupo controle (CT) (~126,4 timolftaleína/min/L/OD).

Nas células osteoblásticas, a atividade de ALP também foi significativamente mais alta nos grupos AHP-B (~2434,2 timolftaleína/min/L/OD), NEOMTA-P (~2224,3 timolftaleína/min/L/OD) e BIO-C (~2104,5 timolftaleína/min/L/OD) em comparação com o CT (~1656,6 timolftaleína/min/L/OD) (Figura 3b). O grupo MTA-F apresentou a menor atividade de ALP tanto nas hDPCs quanto nas células Saos-2. Após cinco dias de exposição aos cimentos, a atividade de ALP nas hDPCs e nas células Saos-2 foi significativamente mais alta do que no grupo CT, exceto no grupo MTA-F. As hDPCs expostas ao NEOMTA-P mostraram a maior atividade de ALP (Fig. 3a), enquanto o AHP-B induziu a maior atividade de ALP nas células Saos-2 (Figura 3b).

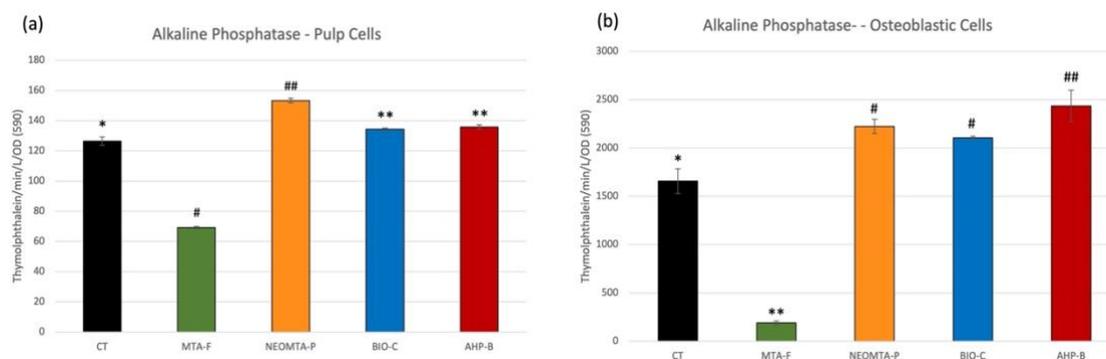


Figura 3 - Atividade da fosfatase alcalina (ALP) de células da polpa dentária humana (hDPCs) e células osteoblásticas (Saos-2) expostas a AHP-B, NEOMTA-P, BIO-C e MTA-F. (a, b) Exceto

pelo MTA-F, ambas as células apresentaram ALP significativamente maior que CT após exposição aos cimentos por cinco dias. No entanto, os hDPCs expostos ao NEOMTA-P apresentaram ALP mais elevada do que os outros grupos (a). Ao mesmo tempo, a ALP de Saos-2 foi maior após exposição ao AHP-B (b). Estatísticas: One-way ANOVA e pós-teste Bonferroni. Símbolos diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos (média \pm DP, $p < 0,05$).

Mineralização

As hDPCs expostos ao AHP-B (~78,41%), NEOMTA-P (~86,79%) e BIO-C (~77,22%) em meio osteogênico durante 15 dias apresentaram nódulos intensamente corados com vermelho de Alizarina (ARS), com uma porcentagem significativamente maior de áreas mineralizadas em comparação ao controle (CT), que mostrou apenas ~10,7% de mineralização (Figura 4a e 4c). O grupo tratado com MTA-F demonstrou uma área mineralizada significativamente menor em relação aos outros grupos, alcançando apenas ~31,3%, enquanto o CT manteve-se em ~10,7%.

Da mesma forma, as células osteoblásticas (Saos-2) exibiram um padrão semelhante de coloração com ARS após exposição ao NEOMTA-P (~82,23%), AHP-B (~79,05%) e BIO-C (~78,39%). Esses grupos apresentaram áreas significativamente maiores de mineralização em comparação ao CT, que obteve ~67% (Figura 4b). O MTA-F, por outro lado, foi o grupo que apresentou a menor área mineralizada, com apenas ~2,21%, além de demonstrar uma redução significativa no número de células sobreviventes (Figura 4c).

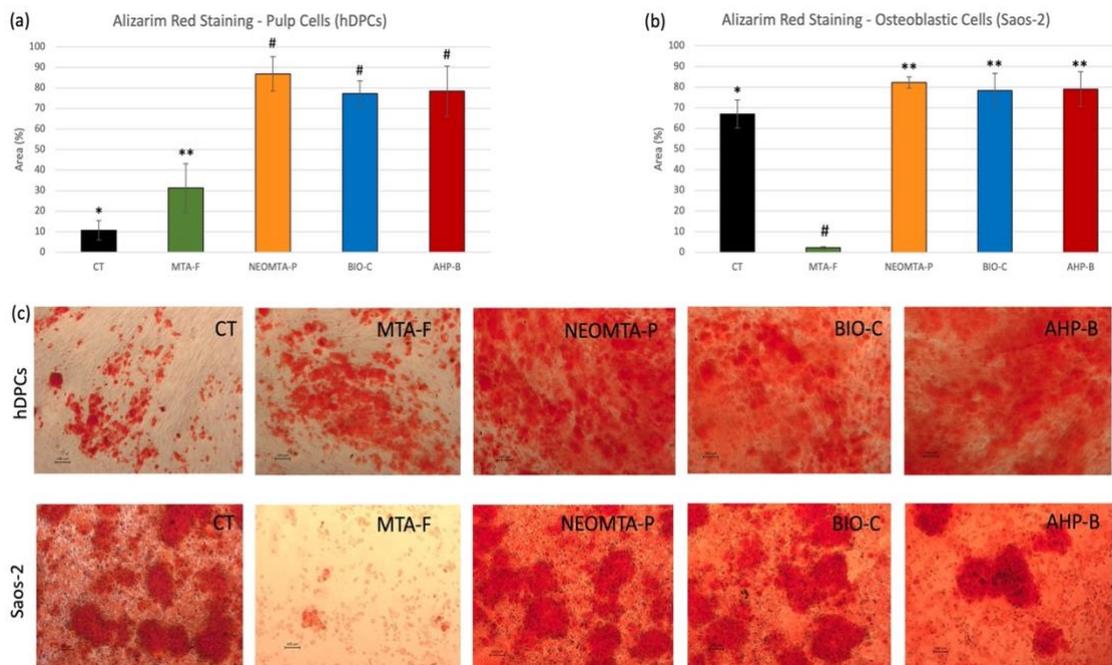


Figura 4 - Mineralização em culturas de hDPCs e Saos-2 como marcador tardio de diferenciação osteoblástica. (a) Após 15 dias de exposição dos hDPCs aos cimentos, as áreas coradas com vermelho de Alizarina (ARS) foram maiores que CT, sem diferença estatística entre AHP-B, NEOMTA-P ou BIO-C. (b) Também não houve diferença estatística entre AHP-B, NEOMTA-P e BIO-C no percentual de áreas ARS de Saos-2. Entretanto, o grupo MTA-F apresentou poucos nódulos mineralizados em Saos-2 (b). (c) As imagens representativas de ARS em hDPCs e Saos-2 mostram nódulos intensos corados com cálcio nos grupos NEOMTA-P, BIO-C e AHP-B (barras de escala de 100 μ m). O grupo MTA-F apresentou menos células com nódulos de ARS mal corados, especialmente em Saos-2 (c). Estatísticas: One-Way ANOVA e pós-teste Bonferroni. Símbolos diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos (média \pm DP, $p < 0,05$).

3.4 DISCUSSÃO

Neste estudo, os cimentos biocerâmicos afetaram de maneira diferente as hDPCs e as Saos-2. Quando colocados dentro do canal radicular, os materiais empregados no tratamento endodôntico devem buscar manter o contato mínimo com os tecidos perirradiculares. No entanto, durante o tratamento, há a possibilidade de esses cimentos extravasarem através dos forames apicais, canais laterais ou canais acessórios, que ainda podem conter células da polpa vital remanescentes após a instrumentação, podendo impactar os tecidos de diferentes formas [12]. Assim, o cimento não deve induzir dano a esses tecidos nem dificultar o processo de cicatrização do tecido [17]. A composição do

cimento é provavelmente responsável pelo comportamento celular, especialmente o AHP-B, que contém carbonato de lítio, dimetilsulfóxido (DMSO) e menos silicato tricálcico. O lítio é um agente osteoprotetor que ativa vias de sinalização, como BMP-2 (proteína morfogenética óssea-2), Wnt/ β -catenina (Wingless/beta-catenina) e PI3K/Akt (quinase 3-fosfatidilinositol/proteína quinase B) [18]. O DMSO aumenta a absorção de outros compostos através das membranas celulares, aumentando sua eficácia [19] e a biodisponibilidade de cálcio [20].

Curiosamente, os grupos MTA-F, AHP-B e BIO-C mostraram uma diminuição imediata do cálcio no meio (Ca^{2+}) após 1h de incubação. O equilíbrio entre a hidratação do cimento e a sua concentração de silicatos de cálcio (CaSi) pode explicar esse resultado [21]. Durante os estágios iniciais da hidratação, o cimento forma uma camada fina de subprodutos em sua superfície, que adsorvem ou reagem com Ca^{2+} do meio, reduzindo o Ca^{2+} no sobrenadante [22]. Diferente dos outros cimentos, o NEOMTA-P tem o maior conteúdo de CaSi (NEOMTA-P, 72% > BIO-C, 65% > AHP-B, 15% > MTA-F, 13%; (Tabela 1) e liberou uma quantidade significativa de Ca^{2+} já nas primeiras horas de imersão no meio de cultura. O NEOMTA-P apresentou uma solubilidade de ~9% e uma liberação de Ca^{2+} de 126 ppm após 24 horas de incubação em água desionizada [23,24]. Em nosso estudo, o BIO-C liberou uma concentração aumentada de Ca^{2+} após 3 horas de incubação e manteve uma liberação de mais de 110 ppm até 96 horas em DMEM. Em um estudo diferente, a solubilidade do BIO-C foi de ~11,4% [25], e esse cimento liberou 157,3 ppm de Ca^{2+} após 24 horas em DMEM [24], corroborando nossos resultados. No grupo AHP-B, a concentração de Ca^{2+} começou a aumentar após 3h, alcançando uma alta concentração após 72h, o que pode estar relacionado com a solubilidade do cimento durante o tempo prolongado de presa e a liberação de Ca^{2+} para o meio de 24 a 72 horas [21,22]. Em um estudo de análise físico-química [22], a liberação de cálcio do AHP-B foi similar ao nosso estudo (~30,6 ppm após 24 horas de imersão em água destilada e um pico de ~67,5 ppm após 72 horas). Os autores atribuíram esse resultado à baixa porcentagem de silicato tricálcico e à composição geral do AHP-B. A liberação de íons depende das características da estrutura do cimento, que influenciam sua capacidade de absorver água e sua solubilidade, além da permeabilidade do material à difusão de água [22]. A composição do cimento

pode levar a um alto volume de poros abertos; conseqüentemente, este material pode absorver mais água, apresentar maior solubilidade e liberar mais íons, dependendo do conteúdo de partículas reativas de CaSi [22]. Nesse estudo, o AHP-B, o cimento com a menor proporção de silicato de cálcio, apresentou maior solubilidade, volume de poros abertos e absorção de água do que AH Plus, Ceraseal e NeoSealer Flo. O MTA-F apresentou uma diminuição progressiva de Ca^{2+} no meio até 96h. Possivelmente, o MTA-F adsorveu Ca^{2+} do meio de cultura durante todo o experimento. A solubilidade do MTA-F ainda é controversa [26]. A diminuição de Ca^{2+} em 96h que o NEOMTA-P, BIO-C e AHP-B apresentaram provavelmente está correlacionada com a cura completa do cimento.

Após 24 horas de exposição, todos os cimentos se mostraram biocompatíveis tanto com as hDPCs quanto com as Saos-2, com exceção do MTA-F. As hDPCs e as células Saos-2 apresentaram aproximadamente 100% de viabilidade após serem expostas ao NEOMTA-P, que previamente demonstrou ausência de citotoxicidade em outro estudo envolvendo células-tronco da polpa dentária [27]. No entanto, a taxa de viabilidade das hDPCs expostas ao AHP-B foi significativamente mais baixa, em torno de 80%, enquanto as células Saos-2 mantiveram aproximadamente 100% de viabilidade. Em contraste, a exposição ao BIO-C resultou em hDPCs com aproximadamente 100% de viabilidade, enquanto as células Saos-2 apresentaram uma taxa de viabilidade de aproximadamente 78%. Os tempos de presa mais longos observados para o AHP-B e o BIO-C podem contribuir para o aumento da solubilidade e uma maior liberação de compostos do cimento, particularmente compostos resinosos, que poderiam induzir citotoxicidade e afetar adversamente a viabilidade celular [28]. Tanto o AHP-B quanto o BIO-C exibiram uma citotoxicidade inicial leve em fibroblastos humanos do ligamento periodontal[28]. Apesar das taxas de viabilidade mais baixas das hDPCs expostas ao AHP-B e das células Saos-2 expostas ao BIO-C, a maioria das células manteve morfologia normal no ensaio de cicatrização de feridas. De acordo com a ISO 10993-5, tanto o BIO-C quanto o AHP-B foram citotóxicos. Uma taxa de viabilidade inferior a 70% ou mais de 20% das células apresentando alterações morfológicas indicaria citotoxicidade, como observado no grupo MTA-F [28].

O crescimento das hDPCs não foi significativamente afetado pelo NEOMTA-P ou pelo BIO-C no ensaio de *Wound Healing*. No entanto, as hDPCs expostas ao AHP-B exibiram uma maior porcentagem de áreas descobertas, corroborando os resultados do ensaio MTT. Em contraste, as Saos-2 no grupo AHP-B mostraram a maior cobertura após 24h, sugerindo diferenciação celular: uma fase inicial de proliferação celular seguida por uma pausa na proliferação e a síntese da matriz extracelular [16]. As Saos-2 tratadas com BIO-C e NEOMTA-P apresentaram uma desaceleração na proliferação em direção à área da ferida após 24 e 48 horas, sugerindo que as células osteoblásticas podem iniciar a diferenciação mais cedo quando expostas ao BIO-C e NEOMTA-P. É crucial notar que o BIO-C e o NEOMTA-P liberaram grandes quantidades de íons de cálcio no início (1 e 3 horas), enquanto o AHP-B liberou íons de cálcio de 24 a 72 horas. O silicato de cálcio interage com os fluidos ambientais, liberando íons de cálcio (Ca^{2+}) para o meio. A quantidade de cálcio liberada pode ser maior devido a uma proporção mais significativa de silicato de cálcio ou aos aditivos específicos utilizados nas formulações [24]. O cálcio acelera a cicatrização do tecido promovendo a dentinogênese reparadora, recrutando e ativando células produtoras de tecido ósseo [29]. O aumento da sinalização de cálcio pela liberação de íons no meio pode explicar a desaceleração da proliferação das células osteoblásticas em favor da diferenciação nas primeiras horas de incubação do cimento.

Além disso, o DMSO do AHP-B poderia desencadear a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares [20], interferindo na atividade da desidrogenase mitocondrial (MTT) e nos resultados do ensaio de *Wound Healing*. O lítio, outro componente do AHP-B, pode ativar as vias de transdução Wnt/beta-catenina, PI3K/Akt e BMP-2, promovendo atividades osteoblásticas e aumentando a proliferação de osteoblastos [18]. As propriedades do lítio, DMSO e Ca^{2+} podem explicar a resposta das células osteoblásticas ao AHP-B neste estudo. No entanto, um estudo mostrou que o efeito do lítio depende da concentração em células humanas do ligamento periodontal (hPDLCs) [30]. Concentrações ideais de lítio-silicato de cálcio ativaram a expressão gênica de marcadores de mineralização nas hPDLCs. No entanto, altas concentrações desaceleraram a proliferação e impactaram significativamente a atividade de ALP [30].

Possivelmente, a proporção de lítio-silicato de cálcio que se liberou do AHP-B afetou as hDPCs de forma semelhante, desacelerando a proliferação.

Nas células osteoblásticas expostas ao AHP-B, a ALP foi mais alta do que no NEOMTA-P e no BIO-C, enquanto a atividade de ALP nas hDPCs foi significativamente mais alta no grupo NEOMTA-P. A atividade de ALP é um marcador muito precoce de diferenciação osteoblástica, e a liberação de Ca^{2+} dos cimentos após 72h, o DMSO e o lítio do AHP-B podem também explicar esses resultados. Osteoblastos humanos cultivados em meios osteogênicos suplementados com concentrações crescentes de DMSO apresentaram aumento de ALP e mineralização [31]. Durante a mineralização, o gradiente de Ca^{2+} ativa primeiro a ALP, mas concentrações muito altas de Ca^{2+} inativam gradualmente a enzima, já que o Ca^{2+} compete com o zinco pelos domínios catalíticos M1 e M2 da ALP [32]. Um estudo que avaliou a estrutura cristalina e as respostas biológicas de células-tronco da polpa dentária (hDPSCs) a enxertos ósseos dopados com lítio mostrou que os íons de lítio favoreceram a entrada do β -fosfato tricálcico nos sítios de cálcio e nos sítios de vacância de cálcio [12]. No entanto, concentrações de lítio superiores a 10% induziram instabilidade cristalina, liberaram íons de lítio em grande quantidade e não mostraram melhora na ALP ou no potencial de mineralização das hDPSCs [12]. O aumento na expressão da enzima fosfatase alcalina (ALP) em células expostas ao cimento à base de silicato de cálcio, mantendo a proliferação celular, sugere a capacidade potencial desses materiais em promover a diferenciação osteogênica [27]. O tratamento prolongado com cloreto de lítio (LiCl) na cultura de células da polpa dentária de camundongos inibiu a diferenciação [31]. A inibição do LiCl sobre a osteogênese das hDPCs não foi mediada pela via Wnt/ β -catenina, sugerindo que a dentinogênese reparadora pode envolver múltiplas vias [32]. Esses resultados podem explicar o comportamento das hDPCs expostas ao AHP-B em nosso estudo. Em resumo, o novo cimento biocerâmico à base de silicato de cálcio, AHP-B, não estimulou as hDPCs durante a diferenciação precoce, como fizeram os cimentos NEOMTA-P e BIO-C, embora tenha estimulado as células osteoblásticas.

Baseado na literatura científica, este estudo *in vitro* tenta simular o ambiente clínico. No entanto, uma limitação deste estudo é que certas variáveis podem, *in vivo*, alterar o desempenho dos cimentos avaliados, e ele não reflete

completamente a complexidade das condições *in vivo*. A ausência de fatores sistêmicos e a curta duração da exposição celular limitam a extrapolação dos resultados para cenários clínicos a longo prazo. Além disso, pode-se considerar a diversidade de células que responderão aos cimentos endodônticos *in vivo*, como osteoblastos, células da polpa dentária remanescente, células do ligamento periodontal, osteoclastos e macrófagos, entre outras. De fato, há algumas incertezas sobre o comportamento dos materiais biocerâmicos *in vivo*, particularmente a longo prazo. Por fim, pesquisas *in vitro* e *in vivo* são complementares e essenciais para o avanço do conhecimento científico e o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

3.5 CONCLUSÃO

Os cimentos biocerâmicos AH-P, NEOMTA-P e BIO-C apresentaram uma capacidade diferenciada de induzir osteogênese em células da polpa dentária humana (hDPCs) e em células osteoblásticas (Saos-2), demonstrando comportamentos biológicos distintos entre esses dois tipos celulares. O cimento endodôntico AHP-B, em particular, destacou-se por promover uma resposta precoce mais acentuada nas células osteoblásticas, o que sugere um potencial clínico elevado para aplicação em reparações ósseas. Por outro lado, o NEOMTA-P foi o material que mais estimulou as células hDPCs, indicando uma maior adequação para o tratamento de tecidos pulpares.

Os componentes químicos presentes nos cimentos, como o lítio, o DMSO e o cálcio, desempenharam um papel crucial na diferenciação celular, afetando diretamente a proliferação e a atividade osteogênica. As concentrações dessas substâncias variaram entre os cimentos, influenciando seu desempenho e características bioativas, sugerindo que o ajuste dessas proporções pode ser uma estratégia promissora para otimizar os resultados clínicos. Além disso, a presença do lítio no cimento AHP-B, conhecido por ativar vias de sinalização como BMP-2 e Wnt/ β -catenina, mostrou-se particularmente relevante para a osteogênese. No entanto, é importante destacar que concentrações excessivas de lítio ou cálcio podem alterar negativamente a resposta celular, interferindo na capacidade de proliferação e diferenciação, o que reforça a necessidade de um controle preciso desses componentes nas formulações.

Os resultados deste estudo fornecem informações valiosas sobre as interações celulares específicas induzidas pelos cimentos biocerâmicos. A compreensão detalhada dessas respostas biológicas poderá guiar a escolha de materiais mais adequados para diferentes contextos clínicos em endodontia, particularmente em tratamentos que envolvem a regeneração óssea e tecidual. Pesquisas futuras, especialmente *in vivo*, serão essenciais para validar essas descobertas e explorar novas possibilidades de formulação que maximizem os benefícios clínicos dos cimentos biocerâmicos

FINANCIAMENTO E APOIO

Este trabalho foi apoiado pela Universidade de Brasília (PROAP/DGP), Brasil. Os autores agradecem ao Laboratório de Microscopia da Universidade de Brasília pela cooperação com as imagens micrográficas.

REFERÊNCIAS

1. Zhou H, Shen Y, Zheng W, Li L, Haapasalo M. A Comprehensive Review of Endodontic Sealers: Properties, Components, and Clinical Applications. *J Endod.* 2021;47(7), 1085-1097.
2. Nair PNR, & Love RM. Biocompatibility and Tissue Regeneration in Endodontic Sealers. *J Endod.* 2021;47(6), 832-845.
3. 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(4):225–8.
4. Alves Silva EC, Tanomaru-Filho M, da Silva GF, Delfino MM, Cerri PS, Guerreiro-Tanomaru JM. Biocompatibility and Bioactive Potential of New Calcium Silicate-based Endodontic Sealers: Bio-C Sealer and Sealer Plus BC. *J Endod.* 2020;46(10):1470-1477.
5. Koch K. Bioceramic technology a game changer in endodontic obturation. *Art of Dentistry.* 2011; 9: 164-173.
6. Koch KA, Brave DG. Bioceramics, Part II: The clinician's viewpoint. *Dent Today.* 2012;31:118-122.

7. Donnermeyer D, Schemkämper P, Bürklein S, Schäfer E. Short and Long-Term Solubility, Alkalinizing Effect, and Thermal Persistence of Premixed Calcium Silicate-Based Sealers: AH Plus Bioceramic Sealer vs. Total Fill BC Sealer. *Materials*. 2022;19:15(20):7320.
8. Yang C, Madhu V, Thomas C, Yang X, Du X, Dighe AS, et al. Inhibition of differentiation and function of osteoclasts by dimethyl sulfoxide (DMSO). *Cell Tissue Res*. 2015; 30:362(3):577–85.
9. Hajji H, Le Gallet S, Saviot L, Ben Salem E, Millot N. Mechanosynthesis of carbonate and lithium co-substituted hydroxyfluorapatite. *Materials Research Bulletin*. 2022;150:111750.
10. Matsumoto N, Yoshida K, Hashimoto K, Toda Y. Thermal stability of β -tricalcium phosphate doped with monovalent metal ions. *Materials Research Bulletin*. 2009;44(9):1889–94.
11. Yoo KH, Kim Y, Kim YI, Bae MK, Yoon SY. Lithium doped biphasic calcium phosphate: Structural analysis and osteo/odontogenic potential *in vitro*. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022; 8(10): 993126
12. Queiroz, M.B., Torres, F.F.E., Rodrigues, E.M., Viola, K.S., Bosso-Martelo, R., Chavez-Andrade, G.M. et al. Physicochemical, biological, and antibacterial evaluation of tricalcium silicate-based reparative cements with different radiopacifiers. *Dent Mater*. 2021;37(2), 311–320.
13. 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;11;55(10):1066–80.
14. Patil R, Kale AD, Mane DR, Patil D. Isolation, culture and characterization of primary cell lines of human buccal mucosal fibroblasts: A combination of explant enzymatic technique. *J Oral Maxillofac Pathol* 2020;24:68-75
15. 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;18:11(1).

16. Gomes-Cornélio, A. L. *et al.* Bioactivity of MTA plus, Biodentine and an experimental calcium silicate-based cement on human osteoblast-like cells. *Int. Endod. J.* 2015;50, 39–47
17. Aminoshariae A, Kulild JC. The impact of sealer extrusion on endodontic outcome: A systematic review with meta-analysis. *Aust Endod J.* 2020;46:123–129
18. Wong SK, Chin KY, Ima-Nirwana S. The Skeletal-Protecting Action and Mechanisms of Action for Mood-Stabilizing Drug Lithium Chloride: Current Evidence and Future Potential Research Areas. *Front Pharmacol.* 2020;7:11:430.
19. Hoang C, Nguyen AK, Nguyen TQ, Fang W, Han B, Hoang BX, Tran HD. Application of Dimethyl Sulfoxide as a Therapeutic Agent and Drug Vehicle for Eye Diseases. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2021;37(8):441-451.
20. Koutroulis A, Kuehne SA, Cooper PR, Camilleri J. The role of calcium ion release on biocompatibility and antimicrobial properties of hydraulic cements. *Sci Rep.* 2019;13:9(1):19019.
21. Morley P, Whitfield JF. The differentiation inducer, dimethyl sulfoxide, transiently increases the intracellular calcium ion concentration in various cell types. *J Cell Physiol.* 1993;156(2):219-25.
22. 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;11;23(22):13914.
23. Siboni F, Taddei P, Prati C, Gandolfi MG. Properties of NeoMTA Plus and MTA Plus cements for endodontics. *Int Endod J.* 2017;14:50:e83–94.
24. Sanz JL, López-García S, Lozano A, *et al.* Microstructural composition, ion release, and bioactive potential of new premixed calcium silicate-based endodontic sealers indicated for warm vertical compaction technique. *Clin Oral Investig.* 2021;25(3):1451-1462.
25. Silva EM, Alcalde MP, Vivian RR, Pomini M, Tanomaru-Filho M, Duarte MAH. Evaluation of *in vitro* experimental model for analysis of bioceramic sealers. *Braz Oral Res.* 2022;10:36:e100.

26. Amoroso-Silva PA, Guimarães BM, Marciano MA, Duarte MA, Cavenago BC, Ordinola-Zapata R, Almeida MM, Moraes IG. Microscopic analysis of the quality of obturation and physical properties of MTA Fillapex. *Microsc Res Tech*. 2014;77(12):1031-6.
27. Sismanoglu S, Ercal P. Effects of calcium silicate-based cements on odonto/osteogenic differentiation potential in mesenchymal stem cells. *Aust Endod J*. 2023 Apr;49(1):66-74
28. 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(7):871-879.
29. Khoswanto C, Dewi IK. MTA as modulator of periapical tissue healing in rat molar: A histological study. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2024;14(2):201-204.
30. Zhang Q, Chen L, Chen B, Chen C, Chang J, Xiao Y, Wu C, Yan F. Lithium-calcium-silicate bioceramics stimulating cementogenic /osteogenic differentiation of periodontal ligament cells and periodontal regeneration. *Appl Mater Today*. 2019; 16: 375-387.
31. Stephens AS, Stephens SR, Hobbs C, Hutmacher DW, Bacic-Welsh D, Woodruff MA, Morrison NA. Myocyte enhancer factor 2c, an osteoblast transcription factor identified by dimethyl sulfoxide (DMSO)-enhanced mineralization. *J Biol Chem*. 2011;286(34):30071-86.
32. Hoylaerts MF, Van Kerckhoven S, Kiffer-Moreira T, Sheen C, Narisawa S, Millán JL. Functional significance of calcium binding to tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *PLoS One*. 2015;16;10(3):e0119874.

CAPÍTULO 4

**CIMENTOS À BASE DE SILICATO DE CÁLCIO MOSTRAM DIVERSO
POTENCIAL PARA INDUZIR MINERALIZAÇÃO EM CÉLULAS
OSTEOBLÁSTICAS HUMANAS**

*Artigo publicado: "CALCIUM SILICATE-BASED CEMENTS CAUSE ENVIRONMENTAL STIFFNESS AND SHOW DIVERSE POTENTIAL TO INDUCE OSTEOGENESIS IN HUMAN OSTEOBLASTIC CELLS". Nature Scientific Reports <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96353-0>

CAPÍTULO 4

Resumo

Objetivos: Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial de seis cimentos de silicato de cálcio em induzir mineralização em cultura de células osteoblásticas humanas (Saos-2): Bio-C® Repair (Bio-C) e PBS HP® (PBSHP), Biodentine™ (Biodentine), MTA Repair-HP (MTA-HP), NeoMTA Plus® (NeoMTAP) e ProRoot® MTA (ProRoot). **Materiais e métodos:** Os cimentos foram depositados em dispositivos do tipo *transwells* para exposição das células a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂. As células expostas apenas em meio de cultura constituíram o grupo controle (CT). Posteriormente, as Saos-2 foram submetidas ao ensaio de mineralização com coloração de vermelho de Alizarina e microscopia óptica. **Estatística:** ANOVA, Bonferroni, $p < 0,05$ ($n=9$ /grupo). **Resultados:** As células expostas a Bio-C, NeoMTA, PBS-HP e ProRoot apresentaram alto potencial de mineralização. A análise estatística mostrou um aumento significativo da coloração para todos os grupos de cimento em comparação com o CT, exceto Biodentine e ZOE. **Conclusões:** Os resultados mostraram potencial de osteoindução dos cimentos. As células expostas a Bio-C, PBS-HP, Pro-Root, NeoMTA-P e MTA-HP parecem atingir precocemente fases de diferenciação avançadas ou intermediárias. **Relevância clínica:** O potencial bioativo do cimento de silicato de cálcio impacta diretamente a escolha do material em endodontia reparadora ou regenerativa. O cimento que induz rapidamente a diferenciação dos osteoblastos pode ser ideal para fins reparadores e regenerativos, uma vez que leva prontamente à deposição de dentina ou osso.

Palavras-chave: Cimento Silicatado, Biomaterial, Ensaio de Migração Celular, Osteoblastos.

Abstract

Objectives: This study aimed to evaluate the potential of six calcium silicate cements to induce mineralization in human osteoblastic cell cultures (Saos-2): Bio-C® Repair (Bio-C), PBS HP® (PBSHP), Biodentine™ (Biodentine), MTA Repair-HP (MTA-HP), NeoMTA Plus® (NeoMTAP), and ProRoot® MTA (ProRoot). **Materials and Methods:** The cements were placed in transwell devices to expose the cells at 37°C, 95% humidity, and 5% CO₂. Cells exposed only to culture medium constituted the control group (CT). Subsequently, the Saos-2 cells underwent a mineralization assay with Alizarin Red staining and optical microscopy. **Statistics:** ANOVA, Bonferroni, $p < 0.05$ ($n = 9/\text{group}$). **Results:** Cells exposed to Bio-C, NeoMTA, PBS-HP, and ProRoot showed high mineralization potential. Statistical analysis revealed a significant increase in staining for all cement groups compared to the CT, except for Biodentine and ZOE. **Conclusions:** The results demonstrated the osteoinductive potential of the cements. Cells exposed to Bio-C, PBS-HP, ProRoot, NeoMTA-P, and MTA-HP appear to reach advanced or intermediate differentiation stages early. **Clinical relevance:** The bioactive potential of calcium silicate cement directly influences material selection in reparative or regenerative endodontics. Cement that rapidly induces osteoblast differentiation may be ideal for reparative and regenerative purposes, as it promptly leads to dentin or bone deposition. **Keywords:** Silicate Cement, Biomaterial, Cell Migration Assays, Osteoblasts.

4.1 INTRODUÇÃO

O reparo de perfurações radiculares, reabsorções radiculares e ápice aberto representa um desafio para os endodontistas, principalmente devido à necessidade de formação de tecidos mineralizados [1]. Esse desafio impulsionou a evolução dos cimentos à base de silicato de cálcio, com propriedades biocompatíveis e bioativas aprimoradas [1]. Nesse contexto, o Agregado Trióxido Mineral (MTA) tornou-se um marco no uso de cimentos desse tipo para tratamentos endodônticos reparadores [1].

O MTA é considerado o precursor dos novos cimentos à base de silicato de cálcio [2]. Sua formulação inicial era composta por silicatos de cálcio, óxido de bismuto (Bi_2O_3), carbonato de cálcio, sulfato de cálcio e aluminato de cálcio [1]. No entanto, devido ao manchamento causado pelo óxido de bismuto na estrutura dentinária e com o objetivo de melhorar sua biocompatibilidade, o óxido de bismuto foi substituído por tungstato de cálcio (CaWO_4) como radiopacificador [2]. Ensaios clínicos confirmaram o MTA como material de escolha para obturação retrógrada e tratamento de perfurações radiculares [3]. Ainda assim, o MTA apresentava desvantagens, como dificuldade de manuseio, descoloração dentária, tempo de presa inicial rápido (30 minutos) e presa final prolongada (até 10 horas), o que levou ao desenvolvimento de novos cimentos de silicato de cálcio [4,5]. Esses novos materiais visavam aumentar a biocompatibilidade, melhorar o fluxo e otimizar a liberação de íons cálcio [1,5].

A liberação de íons Ca^{2+} , particularmente, é fundamental, pois aumenta a formação de hidróxido de cálcio por meio das reações químicas entre os silicatos tricálcico e dicálcico durante a presa do material [4]. Um exemplo dessa evolução é o Biodentine, um dos primeiros cimentos desenvolvidos como substituto bioativo do MTA para terapias reparadoras e regenerativas [6]. Os componentes mais comuns desses novos cimentos incluem óxidos de cálcio, carbonatos de cálcio, hidróxido de cálcio ou fosfatos de cálcio, combinados com silicatos de cálcio e radiopacificadores [7,8]. O Biodentine, por exemplo, utiliza óxido de zircônio como agente radiopacificador, além de silicato tricálcico e dicálcico [6].

Estudos recentes, como o de Rathinam *et al.* [9], demonstraram que cimentos à base de silicato de cálcio, como o Biodentine e o ProRoot MTA, alteram a dinâmica intracelular e extracelular de Ca^{2+} , resultando em elevado potencial de mineralização em células-tronco da polpa dentária humana (hDPSCs). O estudo mostrou que o Biodentine desencadeou uma superexpressão do gene BMP-2, em contraste com o ProRoot MTA, que regulou negativamente essa expressão [9]. Esses achados indicam que a liberação de Ca^{2+} pelo Biodentine foi maior, melhorando a mineralização [9]. Embora o Biodentine tenha apresentado efeitos antimicrobianos significativos, sua citotoxicidade antes da presa completa ainda é uma limitação apontada por alguns estudos [10,11]. Além disso, a necessidade de equipamentos específicos para preparo do material também é uma desvantagem [11-12].

Recentemente, o Bio-C Repair, um cimento a base silicato de cálcio pronto para uso, foi introduzido no mercado para tratamentos endodônticos reparadores e regenerativos. O fabricante afirma que o Bio-C Repair compartilha as propriedades biológicas do MTA, mas com maior facilidade de manuseio. Esse material evoluiu a partir do MTA Repair HP, que utiliza tungstato de cálcio como radiopacificador, enquanto o Bio-C Repair adota o óxido de zircônio [13]. Estudos indicam que o Bio-C Repair aumenta o potencial de mineralização odontogênica em células-tronco de dentes decíduos esfoliados, de maneira semelhante ao Biodentine, o que o torna uma opção terapêutica para capeamento pulpar e pulpotomia, promovendo a cicatrização pulpar e formação de dentina reparadora [14]. Outro estudo, comparou a capacidade do Bio-C Repair e Biodentine em relação à diferenciação odontogênica avaliando a expressão de genes importantes como *BSP*, proteína não colágena que participa da codificação genética e funciona como um regulador durante a formação de tecidos duros, como dentina, cimento e osso alveolar. Os resultados apontam que ambos tem a mesma capacidade de induzir diferenciação osteogênica e odontogênica em hDPSCs [15]

Com o intuito de melhorar as propriedades do MTA, cimentos a base de silicato de cálcio em cápsulas (Biodentine) ou “prontos para uso”(Bio-C Repair) foram introduzidos no mercado. Mantendo sua afinidade com a umidade esses cimentos se caracterizam pela biocompatibilidade e potencial de mineralização. Como as interações biológicas ocorrem imediatamente após o contato desses

materiais com o tecido subjacente, o tempo de presa pode influenciar essas interações com as células até a cura completa do material [16]

As propriedades físico-químicas de outros cimentos, como MTA HP Repair, ProRoot® MTA e NeoMTA Plus®, também mostraram resultados interessantes em relação ao tempo de presa, hidratação e liberação de íons cálcio [13]. O NeoMTA Plus®, em particular, utiliza óxido de tântalo (Ta_2O_5) como radiopacificador, diferentemente do MTA tradicional, e sua formulação em pó-líquido permite sua aplicação tanto como cimento reparador quanto obturador, promovendo regeneração e reparação devido à sua capacidade de induzir mineralização [13]. Um estudo investigou as reações locais e a formação óssea nos tecidos subcutâneo e ósseo de ratos após a exposição aos cimentos NeoMTA Plus, MTA Repair Hp e Biodentine. Foi observada uma resposta inflamatória nos tecidos subcutâneos e intraósseos nos primeiros 7 dias, a qual diminuiu significativamente com o tempo. Além disso, foi registrado um aumento considerável na formação óssea ao longo do período de observação, concluindo que os materiais biocerâmicos causaram inflamação local e modificações nos tecidos logo após a implantação subcutânea, com uma redução desses efeitos ao longo do tempo. Na implantação intraóssea, todos os materiais promoveram a formação de novo tecido ósseo [17]

O PBS Cimmo HP®, que inclui silicato dicálcico, óxidos minerais e pozolana em sua composição também é uma opção de cimento reparador existente no mercado. Estudos preliminares indicam que o PBS HP pode ser eficaz como material de enxerto em implantes dentários, induzindo a neoformação óssea e mantendo a integração entre osso, cimento e implante [18]. Imagens histológicas mostraram fibroblastos recém-formados, células osteóides e tecido ósseo mineralizado envolvendo o PBS-HP. Em estudo realizado com células do ligamento periodontal o PBS-HP apresentou alta atividade metabólica e proliferação celular, além de apresentar bom selamento hermético, biocompatibilidade e bioatividade. No entanto, a literatura carece de estudos sobre o efeito citotóxico e da capacidade de induzir uma mineralização em células osteoblásticas [19].

Em resumo, Os cimentos a base de silicato de cálcio desempenham um papel importante na ativação da expressão de proteínas ósseas sendo essenciais para os processos de diferenciação e mineralização celular [20]. A formação de uma

camada superficial de apatita provavelmente facilita a diferenciação osteogênica, promovendo a atividade dos osteoblastos na produção e mineralização de novo tecido ósseo, por meio da deposição de cristais de apatita [21]. Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial de mineralização do Bio-C, PBS-HP, Biodentine, ProRoot, NeoMTA-P e MTA-HP em culturas de células osteoblásticas humanas (Saos-2). A escolha de células do tipo Saos-2 foi baseada em outros trabalhos e por serem consideradas um modelo adequado para esse tipo de estudo [11].

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Cultura de Sãos-2

As células osteoblásticas humanas Saos-2 (ATCC® HTB-85™), frequentemente utilizadas como modelo de osteogênese *in vitro*, foram inicialmente cultivadas em monocamada em frascos de cultura T-75 (Corning, Union City, CA, EUA). O meio de cultura utilizado foi o Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e mantido em uma incubadora a 37°C, com 95% de umidade e 5% de CO₂ (todos os reagentes foram adquiridos da Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA). As condições de cultura foram rigorosamente monitoradas para garantir a viabilidade celular e a manutenção de um ambiente fisiológico adequado para o crescimento osteoblástico.

Após atingirem confluência, as células Saos-2 foram destacadas do frasco utilizando uma solução de tripsina-EDTA (0,25%) por um período controlado de 3 a 5 minutos, garantindo a manutenção da integridade celular durante o processo de descolamento. Em seguida, as células foram resuspendidas em meio fresco e semeadas em placas de 12 poços (Corning, Union City, CA, EUA) a uma densidade de 2×10^4 células/poço. As placas foram incubadas nas mesmas condições já descritas até que as células aderissem completamente ao fundo dos poços, o que foi verificado por inspeção microscópica.

Para os experimentos, as células aderidas foram expostas a amostras de cimento previamente manipulados e acondicionadas em transwells com

membranas permeáveis de 0,4 μm (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA), permitindo a difusão de fatores solúveis entre o material testado e as células. Esse sistema foi escolhido para simular um ambiente de contato indireto entre o biomaterial e as células, minimizando efeitos mecânicos diretos e focando nas interações bioquímicas. As células que não foram expostas ao material de teste constituíram o grupo controle (CT).

Os experimentos foram conduzidos em triplicata independente ($n = 9$ por grupo experimental) para garantir a reprodutibilidade dos resultados. Para a avaliação da mineralização osteoblástica, foi utilizado o ensaio de coloração com vermelho de alizarina (ARS), um marcador clássico de deposição de cálcio. As células, tanto as expostas ao material de teste quanto as do grupo controle, foram cultivadas em meio osteogênico, composto por DMEM suplementado com 10% de SFB, 100 UI/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina, 0,0023 g/mL de β -glicerofosfato e 0,055 mg/mL de L-ascorbato (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, EUA). A exposição ao meio osteogênico foi mantida nas mesmas condições de incubação já descritas, por um período de 21 dias, com troca de meio a cada 3 dias.

Ao final do período experimental, as placas foram submetidas ao ensaio de ARS para detecção da mineralização extracelular, sendo as áreas coradas quantificadas utilizando um software de análise de imagem. Esse procedimento permitiu a comparação quantitativa entre os grupos expostos ao cimento e os controles, fornecendo dados robustos sobre o potencial osteogênico do material testado

4.2.2 Amostras de cimento endodôntico

Os cimentos Bio-C, Biodentine, PBS-HP, MTA-HP, ProRoot, NeoMTA-P (Tabela 1) e o cimento de óxido de zinco-eugenol (ZOE, utilizado como controle negativo) foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, garantindo condições estéreis durante todo o processo de manipulação. A preparação dos cimentos foi realizada em fluxo laminar para evitar a contaminação, seguindo rigorosos protocolos de assepsia.

Cada cimento foi inserido em moldes de polipropileno com dimensões padronizadas de 3 mm de diâmetro por 5 mm de altura. Esses moldes foram

escolhidos para garantir uniformidade nas amostras, permitindo uma comparação direta entre os diferentes materiais. Após a inserção, as amostras de cimento foram incubadas em uma câmara umidificada a 37°C, com 95% de umidade relativa e 5% de CO₂, por um período de 24 horas. Esse ambiente controlado simula as condições fisiológicas e garante que os materiais passem pelo processo de presa de forma completa antes de serem expostos às células.

Ao final do período de incubação, as amostras de cimento foram cuidadosamente removidas dos moldes para garantir que sua integridade estrutural fosse mantida, evitando a geração de fragmentos que pudessem interferir nos experimentos subsequentes. As amostras intactas foram, então, colocadas nos *transwells* com membranas permeáveis de 0,4 µm (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA). Esse sistema de *transwell* foi escolhido para permitir a exposição indireta das células Saos-2 aos cimentos, garantindo que apenas fatores solúveis liberados pelos materiais tivessem contato com as células, eliminando a possibilidade de efeitos mecânicos diretos ou contaminantes.

As inserções de *transwell* contendo as amostras de cimento foram posicionadas em placas de 12 poços previamente semeadas com células osteoblásticas humanas Saos-2, cultivadas até a adesão completa em meio de cultura adequado (DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL), sob as mesmas condições de temperatura e CO₂ mencionadas acima. A escolha deste modelo de exposição indireta permite avaliar os efeitos dos cimentos sobre a viabilidade e função celular de maneira mais próxima à fisiologia, uma vez que simula o ambiente de difusão de íons e fatores de crescimento. O controle negativo do experimento foi o cimento de óxido de zinco-eugenol (ZOE), conhecido por suas propriedades citotóxicas.

Tabela 1: Especificações dos Cimento endodôntico [21]

Marca	Formulação	Tempo de Presa inicial (min)	Composição	Fabricante
ProRoot® MTA	Pó-líquido	165	Pó: óxido de bismuto, silicato tricálcico, silicato dicálcico, dialuminato de cálcio e sulfato de cálcio. Líquido: Água destilada estéril *	Dentsply Sirona Tulsa, OK, EUA
Reparação Bio-C®	"Pronto para uso"	40	Silicatos de cálcio, aluminato de cálcio, óxido de cálcio, óxido de zircônio, óxido de ferro, dióxido de silício e agente dispersante*	Ângelus Londrina, PR, Brasil
PBS HP®	Pó-líquido	5	Pó: Óxido de cálcio, carbonato de cálcio, óxido de magnésio, silicato dicálcico, óxido de alumínio, óxido de sódio, óxido de potássio e pozolana (alto teor de óxido de sílica e alumínio altamente reativo com hidróxido de cálcio). Líquido: Água destilada *	CIMMO MJS Ltda. Pouso Alegre-MG Brasil
Biodentine®	Pó-líquido	12	Pó: Silicato tricálcico, óxido de zircônia, óxido de cálcio, carbonato de cálcio, pigmento amarelo e vermelho, óxido de ferro marrom. Líquido: cloreto de cálcio di-hidratado, água purificada *	Septodonte Saint-Maur-des- Fossés, França
NeoMTA Plus®	Pó-gel	<60	Pó: Silicato tricálcico, silicato dicálcico, óxido de tântalo, aluminato tricálcico, sulfato de cálcio e gesso. Líquido: Gel à base de água e agentes espessantes e polímeros solúveis em água *	Avalon Biomédica Houston, Texas, EUA
Reparo MTA-HP	Pó-líquido	15	Pó: Silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio, tungstato de cálcio. Líquido: Água e Plastificante *	Ângelus Londrina, PR, Brasil

*Informações do fabricante.

4.2.3 Coloração Vermelha de Alizarina (ARS)

Após 15 dias de exposição das células Saos-2 aos diferentes tipos de cimento em meio osteogênico (n=6 por grupo experimental), os poços de cultura foram cuidadosamente lavados três vezes com solução tampão fosfato (PBS 1X), cada lavagem durando 5 minutos. Esse procedimento foi realizado para remover resíduos de meio de cultura e proteínas solúveis sem perturbar as monocamadas de células aderidas. Em seguida, as células foram fixadas em

formaldeído a 10% (v/v, Sigma-Aldrich) por 15 minutos à temperatura ambiente, uma etapa crucial para preservar a estrutura celular e as características morfológicas, garantindo uma coloração precisa e uniforme.

Após a fixação, as monocamadas celulares foram lavadas duas vezes com água destilada estéril (dH₂O), cada lavagem durando 5 minutos, para eliminar qualquer traço residual de formaldeído, que poderia interferir na coloração subsequente. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de solução de vermelho de alizarina (ARS) a 2% (pH 4,1, Sigma-Aldrich) em cada poço, um corante amplamente utilizado para a detecção de depósitos de cálcio extracelular, indicando a mineralização osteoblástica. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 20 minutos, tempo otimizado em estudos preliminares para garantir uma coloração específica dos nódulos mineralizados, evitando a superexposição do corante.

Após a incubação com ARS, os poços foram lavados três vezes com 2 mL de água destilada estéril (dH₂O) para remover o excesso de corante não ligado. Este passo foi realizado com cuidado para evitar a remoção acidental de células ou depósitos mineralizados. A cada lavagem, a placa foi agitada suavemente para garantir a completa eliminação do corante residual, garantindo que apenas as áreas com depósitos de cálcio permanecessem coradas.

As áreas coradas com ARS foram observadas sob um microscópio invertido (Axiovert 100, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) com ampliação de 40x. As imagens das monocamadas coradas foram capturadas com uma câmera acoplada ao microscópio, garantindo alta resolução e fidelidade na captura dos detalhes. Essas imagens digitais foram processadas utilizando o software de análise de imagem ImageJ 1.45 (National Institutes of Health, NIH, EUA), que foi configurado para análise quantitativa da coloração.

Para a quantificação da área corada, todas as imagens capturadas foram convertidas para o formato RGB (Vermelho, Verde, Azul). O canal vermelho, correspondente à coloração do ARS, foi isolado e o limiar ajustado com base nos parâmetros obtidos a partir das imagens do grupo controle (TC), que não foram expostas ao cimento. Isso garantiu a uniformidade da análise entre os grupos experimentais e o controle, evitando viés. A partir dessa calibração, a porcentagem de área corada foi calculada para cada grupo experimental, com base em 18 imagens por grupo (n=18 imagens/grupo).

Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística, comparando as porcentagens de área mineralizada entre os diferentes grupos de cimentos testados, fornecendo informações valiosas sobre o potencial osteogênico de cada material.

4.2.8 Análise Estatística

Os dados obtidos durante o experimento foram submetidos a análises estatísticas utilizando One-way ANOVA (Análise de Variância de um fator) para comparar as médias entre os diferentes grupos experimentais. Essa abordagem foi escolhida por sua robustez em detectar diferenças estatisticamente significativas entre múltiplos grupos, garantindo uma análise eficiente das variações induzidas pelos diferentes tipos de cimentos.

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado previamente, baseado em médias e desvios padrão de um estudo semelhante encontrado na literatura científica [11]. Utilizando uma significância estatística de 5% ($\alpha = 0,05$) e um poder estatístico de 80%, foi determinado que um tamanho amostral de $n=6$ por grupo seria suficiente para detectar diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Para a comparação entre grupos e a identificação de quais grupos apresentavam diferenças significativas, foi realizado o pós-teste de Bonferroni após a ANOVA. Esse teste foi escolhido por ser conservador, ajustando o nível de significância para múltiplas comparações, o que minimiza o risco de falsos positivos. Assim, qualquer diferença entre os grupos experimentais foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software Stata/IC 15.1 (StataCorp, College Station, TX, EUA), um programa amplamente reconhecido pela comunidade acadêmica e científica por suas capacidades avançadas de análise de dados. O uso desse software permitiu o tratamento estatístico preciso dos dados, além de garantir a replicabilidade e a transparência dos resultados. Além disso, gráficos e tabelas de suporte foram gerados para ilustrar de forma clara as diferenças observadas entre os grupos.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Nódulos de Mineralização

O potencial de mineralização das células osteoblásticas Saos-2 expostas aos seis diferentes cimentos reparadores foi avaliado por meio do ensaio de coloração com vermelho de alizarina (Alizarin Red Staining, ARS) e comparado aos grupos controle (CT) e ao cimento de óxido de zinco-eugenol (ZOE), utilizado como controle negativo. Após 15 dias em meio osteogênico, todos os grupos expostos aos cimentos apresentaram uma mineralização significativamente maior em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$), com exceção do Biodentine, que não mostrou diferença estatisticamente significativa em relação ao CT (Figura 1 e 2).

A coloração ARS revelou uma marcante deposição de cálcio nos grupos NeoMTA-Plus, MTA-HP, PBS-HP, ProRoot e Bio-C, indicando uma atividade osteogênica expressiva. Dentre esses, o grupo NeoMTA-Plus destacou-se, apresentando uma camada superior densamente rica em nódulos de mineralização, com uma distribuição uniforme e intensamente corada. A análise microscópica mostrou nódulos mineralizados com morfologia arredondada, estrutura densa e forte intensidade de coloração nos grupos NeoMTA-Plus e MTA-HP, sugerindo uma capacidade de mineralização superior.

Os grupos PBS-HP, ProRoot e Bio-C também exibiram uma coloração ARS robusta, com depósitos de cálcio visíveis, embora de menor intensidade e densidade em comparação com NeoMTA-Plus e MTA-HP. Enquanto isso, o grupo controle (CT) apresentou apenas uma matriz extracelular levemente corada, com escassos nódulos de mineralização, evidenciando baixa atividade osteogênica em ausência dos cimentos reparadores. Por outro lado, o grupo ZOE mostrou resultados visivelmente inferiores. As imagens deste grupo revelaram praticamente nenhuma mineralização, confirmada pela ausência quase completa de nódulos corados. Além disso, observou-se alterações morfológicas nas células, incluindo células encolhidas e sinais de citotoxicidade, reforçando a natureza inadequada desse material para indução de mineralização osteoblástica (Figura 1).

Esses resultados sugerem que os cimentos NeoMTA-Plus, MTA-HP, PBS-HP, ProRoot e Bio-C possuem maior capacidade osteogênica *in vitro*, com destaque para NeoMTA-Plus e MTA-HP, que demonstraram um padrão de

mineralização mais intenso e consistente, enquanto o ZOE, conforme esperado, atuou como comparador negativo com efeitos adversos sobre a viabilidade e mineralização celular.

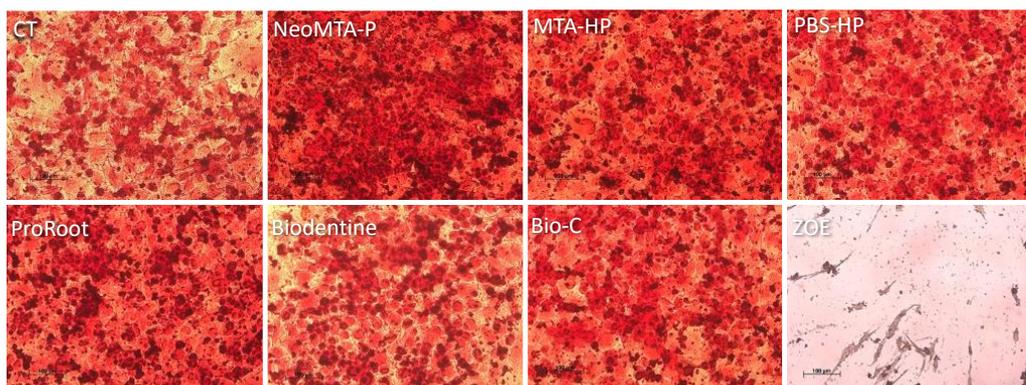


Figura 1 – Imagem representativa dos campos corados com vermelho de alizarina (ARS) de cada grupo de cimentos após 15 dias de exposição. Observa-se a formação de nódulos mineralizados nos grupos NeoMTA-Plus, MTA-HP, PBS-HP, ProRoot, Biodentine e Bio-C, distribuídos por todo o campo, evidenciando a mineralização induzida pelos cimentos. Em contraste, a imagem do grupo ZOE apresenta praticamente nenhuma mineralização e alterações morfológicas significativas, incluindo células encolhidas.

4.3.2 Área coberta por nódulos de cálcio

A análise quantitativa da mineralização foi realizada utilizando o software ImageJ, juntamente com um plugin específico para o cálculo da porcentagem de área corada com vermelho de alizarina (ARS). Os resultados demonstraram uma diferença estatisticamente significativa entre as porcentagens de áreas mineralizadas nos grupos expostos aos cimentos NeoMTA-Plus, MTA-HP, PBS-HP, ProRoot e Bio-C (Figura 2). Dentre esses, o grupo PBS-HP apresentou uma porcentagem de área mineralizada significativamente menor em comparação com NeoMTA-Plus e MTA-HP ($p < 0,05$). No entanto, as células expostas ao PBS-HP ainda mantiveram um

alto potencial de mineralização, com aproximadamente 80% da área corada por ARS, o que foi substancialmente superior ao grupo controle (CT). As células expostas ao cimento ZOE quase nenhuma coloração pela ARS, indicando uma baixa ou ausente atividade de mineralização (Figura 2). A análise quantitativa confirmou que a porcentagem de área corada com ARS no grupo ZOE foi significativamente inferior em comparação com todos os outros grupos experimentais ($p < 0,05$), reforçando seu comportamento citotóxico e ausência de indução de mineralização (Figura 2).

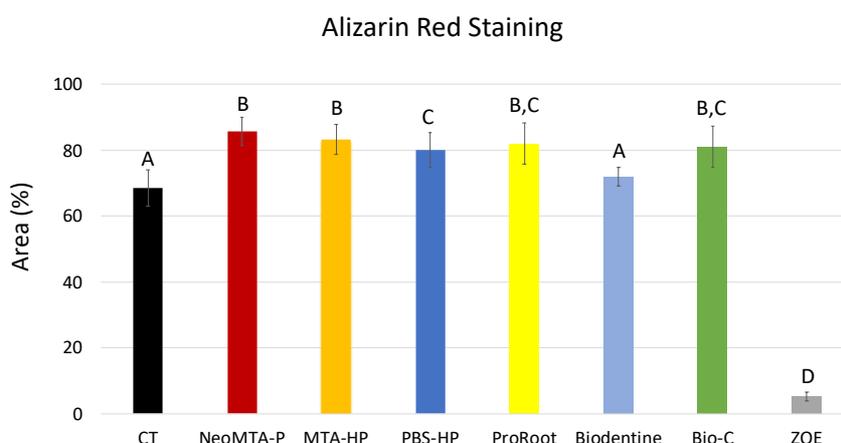


Figura 2- A análise estatística revelou um aumento significativo na coloração por ARS em todos os grupos de cimento em comparação ao controle (CT), com exceção dos grupos Biodentine e ZOE. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP). A análise foi realizada por One-way ANOVA unidirecional, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Os símbolos no gráfico indicam grupos homogêneos conforme o pós-teste de Bonferroni: * $p < 0,001$ para todos os grupos versus CT; # $p < 0,01$ para comparações entre grupos de cimento; $p < 0,05$ para comparações específicas entre grupos de cimento.

4.4 DISCUSSÃO

A indução da mineralização por cimentos endodônticos reparadores é um fator crítico na escolha do material em procedimentos de reparo e regeneração tecidual. A capacidade desses materiais em promover a formação de tecidos mineralizados, como dentina reparadora e osso, está diretamente ligada ao sucesso clínico em casos de perfurações radiculares,

reabsorções e ápices abertos. Neste estudo, o potencial de mineralização de diferentes cimentos à base de silicato de cálcio foi avaliado em culturas de células osteoblásticas humanas (Saos-2), um modelo amplamente utilizado em estudos de osteoindução [5,9,11]. A osteocalcina é conhecida como uma proteína óssea contendo ácido gama-carboxi glutâmico (*BGLAP*) sendo essencial no osso e um marcador chave de mineralização, regulando a taxa desse processo [22]. Além disso, é importante considerar no processo de mineralização que a Fosfatase Alcalina (ALP), *BNSP* e *BGLAP* dividem a osteoblastogênese em três fases: fase inicial (superexpressão de ALPL), fase intermediária (superexpressão de *BNSP*) e fase avançada (superexpressão de *BGLAP*). O elevado potencial de mineralização observado nas células osteoblásticas após 15 dias de exposição com os cimentos NeoMTA-P, ProRoot, Bio-C, MTA-HP e PBS-HP indica que essas células estavam, provavelmente, nas fases intermediária/avançada de diferenciação [22,23,24]. A capacidade de induzir a diferenciação osteogênica desses cimentos está relacionada a alta expressão de *BNSP* (Sialoproteína óssea), uma proteína não colágena envolvida no processo de codificação genética, desempenhando um papel regulador na formação de tecidos rígidos, como dentina, cimento e osso alveolar [15].

A presença massiva de nódulos de mineralização, evidenciada pela coloração com Alizarina Vermelha (ARS) nos grupos NeoMTA-P, ProRoot, Bio-C, MTA-HP e PBS-HP, sugere uma robusta atividade osteoindutora. Essas áreas coradas foram significativamente maiores nesses grupos quando comparadas ao controle. Em contraste, as células expostas ao Biodentine não apresentaram um padrão diferencial de mineralização em relação ao grupo controle (CT), o que está alinhado com a fase inicial de diferenciação e a atividade reduzida de fosfatase alcalina já relatada para o Biodentine [9]. Isso sugere que, enquanto o Biodentine parece ser mais eficaz para células da polpa dentária, como demonstrado em outros estudos, ele pode não ser tão eficaz para células osteoblásticas. Como o material foi desenvolvido para simular a dentina, ele pode ser mais adequado para aplicações pulpares [9,15].

Vale destacar que células de diferentes tecidos apresentam características distintas, como taxas de proliferação, responsividade à sinalização de cálcio e estágios de diferenciação. Por exemplo, um pH mais alto é mais favorável para células osteoblásticas [11]. Os cimentos à base de silicato

tricálcico são reconhecidos por sua alta liberação de íons OH^- , o que eleva o pH do ambiente, favorecendo a osteoindução [10]. O tempo de presa também tem um papel fundamental no desempenho dos materiais em situações clínicas, sendo um fator relevante para a manipulação e estabilização adequadas do cimento [16]. A reação inicial ocorre com a hidratação dos silicatos de di e tricálcio, o que leva à dissolução de íons do material. A dissolução de íons também pode ser influenciada pelas proporções de silicatos dicálcicos e tricálcicos na composição original, além das variações no tempo de presa entre os materiais [16]

Neste estudo, os materiais foram incubados por 24 horas antes da exposição às células, visando sua cura adequada, o que pode ter influenciado positivamente os resultados. Resultados divergentes em outros estudos podem ser atribuídos a tempos de cura menores [9]. As diferentes composições dos cimentos reparadores influenciam diretamente sua biocompatibilidade e a resposta celular [23]. A maior estabilidade dos materiais está associada à menor liberação de compostos tóxicos, o que pode explicar o desempenho superior do ProRoot MTA em células osteoblásticas. Estudos anteriores demonstraram que o ProRoot MTA e o Biodentine causam apenas leve reação inflamatória, podendo induzir uma mineralização exacerbada [24].

Estudos *in vitro* e *in vivo* avaliaram a interação de cimentos biocerâmicos, como NeoMTA e ProRoot MTA, com tecidos biológicos, revelando respostas inflamatórias controladas e a formação de barreiras calcificadas. Esses cimentos também estimularam a produção de matriz mineralizada, essencial para reparos dentários e ósseos, conforme demonstrado pela deposição de cálcio e a atividade da fosfatase alcalina [25,26]. Esses achados corroboram com os resultados deste estudo, onde NeoMTA e ProRoot MTA apresentaram mais de 80% de área corada, indicando nódulos de mineralização significativamente superiores ao controle. A substituição do óxido de bismuto pelo óxido de tântalo como radiopacificador na composição do NeoMTA não apenas previniu a descoloração, mas também potencializou o processo de mineralização, estimulando a diferenciação das células responsáveis pela secreção de minerais [27].

O cimento PBS-HP, que contém pozolana (rico em óxido de sílica e alumínio), se destacou por seu rápido tempo de presa e baixa toxicidade. Neste

estudo, ele apresentou mais de 75% de área corada, indicando uma capacidade significativa de induzir mineralização em células osteoblásticas Saos-2. Estudos adicionais confirmaram sua eficácia em promover deposição de cálcio e fósforo, essenciais para a regeneração óssea, sugerindo que o PBS-HP é uma alternativa promissora a enxertos ósseos autógenos ou aloplásticos [18]. Já o Bio-C apresenta, assim como nesse estudo, elevado potencial de mineralização principalmente pela capacidade em manter o ambiente com pH elevado [28]. Sua compatibilidade está diretamente relacionada ao tempo prolongado de presa e consequentemente pode afetar o seu potencial osteoindutor. Em estudo realizado em ratos (*Rattus norvegicus albinus*) foram observadas de células imunomarcadas para osteocalcina nas amostras do Bio-C, sugerindo um potencial bioativo pois representa um dos principais componentes não colágenos da matriz óssea. Esses materiais biocerâmicos liberam íons de cálcio durante as reações de presa promovendo um ambiente compatível com a osteogênese. [29]. Os resultados obtidos no presente estudo apontam para uma grande bioatividade do Bio-C com campos corados com vermelho de alizarina (ARS) após 15 dias de exposição. Observou-se formação de nódulos mineralizados, distribuídos por todo o campo, evidenciando a mineralização induzida. Estudo *in vivo* concluiu que a facilidade de manipulação, a biocompatibilidade, a atividade antimicrobiana e pontencial indutor de mineralização credenciaram o Bio-C como material para pulpotomia[30]. Em contraste a todos os outros cimentos estudados, as imagens do grupo ZOE não apresentam grandes áreas mineralizadas e alterações morfológicas significativas, características já conhecidas desse cimento comprovadamente citotóxico.

Em conclusão, o potencial osteoindutor dos cimentos à base de silicato de cálcio foi diversificado. Os cimentos Bio-C, PBS-HP, ProRoot, NeoMTA-P e MTA-HP induziram fases mais avançadas ou intermediárias de diferenciação celular quando comparados ao Biodentine, que pode ser mais adequado para tratamento pulpar. Acredita-se que cimentos que induzem rapidamente a diferenciação osteoblástica são ideais para procedimentos regenerativos devido à rápida formação de barreiras mineralizadas. Essa hipótese merece investigação adicional em ensaios clínicos. Considerando a formulação biológica e o comportamento do Bio-C e PBS-HP, eles se apresentam como opções viáveis aos cimentos tradicionais, como ProRoot e NeoMTA-P, em tratamentos

reparadores endodônticos. Os resultados do presente estudo sugerem um potencial osteoindutor diferencial entre os cimentos avaliados.

4.5 REFERÊNCIAS

1. Torabinejad, M., Pitt Ford, T.R., McKennedy, D.J., Abedi, H.R., Miller, D.A. & Kariyawasam, S.P. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *J. Endod.* 23, 225-228 (1997).
2. Daoudi, M.F. & Saunders, W.P. *In vitro* evaluation of furcal perforation repair using mineral trioxide aggregate or resin modified glass ionomer cement with and without the use of the operating microscope. *J. Endod.* 28, 512-515 (2002).
3. Souza, N.J., Justo, G.Z., Oliveira, C.R., Haun, M. & Bincoletto, C. Cytotoxicity of materials used in perforation repair tested using the V79 fibroblast cell line and the granulocyte-macrophage progenitor cells. *Int. Endod. J.* 39, 40-47 (2006).
4. Camilleri, J., Cutajar, A. & Mallia, B. Hydration characteristics of zirconium oxide replaced Portland cement for use as a root-end filling material. *Dent. Mater. J.* 27, 845-854 (2011).
5. Duarte, M.A.H. *et al.* Tricalcium silicate-based cements: properties and modifications. *Braz. Oral Res.* 32, 111-118 (2018).
6. Da Fonseca, T.S. *et al.* Biodentine and MTA modulate immunoinflammatory response favoring bone formation in sealing of furcation perforations in rat molars. *Clin. Oral Investig.* 23, 1237-1252 (2019).
7. Zhang, W., Li, Z. & Peng, B. Assessment of a new root canal sealer's apical sealing ability. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 107, 79-82 (2009).
8. Best, S.M., Porter, A.E., Thian, E.S. & Huang, J. Bioceramics: Past, Present and for the Future. *J. Eur. Ceram. Soc.* 28, 1319-1327 (2009).
9. Rathinam, E. *et al.* The calcium dynamics of human dental pulp stem cells stimulated with tricalcium silicate-based cements determine their differentiation and mineralization outcome. *Sci Rep.* 11(1), 645 (2021)

10. Koutroulis, A., Kuehne, S.A., Cooper, P.R. & Camilleri, J. The role of calcium ion release on biocompatibility and antimicrobial properties of hydraulic cements. *Sci Rep.* 9(1), 19019 (2019).
11. Gomes-Cornélio, A.L. *et al.* Bioactivity of MTA Plus, Biodentine and an experimental calcium silicate-based cement on human osteoblast-like cells. *Int. Endod. J.* 50, 39-47 (2015).
12. Escobar-García, D.M., Aguirre-López, E., Méndez-González, V. & Pozos-Guillén, A. Cytotoxicity and Initial Biocompatibility of Endodontic Biomaterials (MTA and Biodentine™) Used as Root-End Filling Materials. *Biomed. Res. Int.* 1-7 (2016).
13. Jiménez-Sánchez, M.D.C., Segura-Egea, J.J. & Díaz-Cuenca, A. Higher hydration performance and bioactive response of the new endodontic bioactive cement MTA HP repair compared with ProRoot MTA white and NeoMTA plus. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 107, 2109-2120 (2019).
14. Maru V, Madkaikar M, Gada A, Pakhmode V, Padawe D, Bapat S. Response of stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth to Bio-C Repair and Mineral Trioxide Aggregate Repair HP: Cytotoxicity and gene expression assessment. *Dent Res J (Isfahan)*. 2023 Apr 26;20:55.
15. Wairooy VW, Bagio DA, Margono A, Amelia I. *In vitro* Analysis of DSPP and BSP Expression: Comparing the Odontogenic Influence of Bio-C Repair and Biodentine in hDPSCs. *Eur J Dent.* 2024 Jul 19.
16. Ko NC, Noda S, Okada Y, Tazawa K, Kawashima N, Okiji T. Biocompatibility and pro-mineralization effects of premixed calcium silicate-based materials on human dental pulp stem cells: An *in vitro* and *in vivo* study. *Dent Mater J.* 2024 Sep 28;43(5):729-737.
17. Bilge K, Ataş O, Yildiz Ş, Çalik I, Dündar S, Gezer Ataş A. Histological evaluation of tissue reaction and new bone formation of different calcium silicate-based cements in rats. *Aust Dent J.* 2024 Mar;69(1):18-28.
18. Zerbinatti, C.C. *et al.* Bioceramic cement in the filling of bone defects in rats. *Acta Cir. Bras.* 34, 1-7 (2019).
19. Pedrosa MDS, Alves T, Nogueira FN, Holzhausen M, Sipert CR. Cytotoxicity and cytokine production by calcium silicate-based materials

- on periodontal ligament stem cells. *Braz Dent J.* 2021 May-Jun;32(3):65-74.
20. Bernardini C, Zamparini F, Prati C, Salaroli R, Spinelli A, Zannoni A, Forni M, Gandolfi MG. Osteoinductive and regenerative potential of premixed calcium-silicate bioceramic sealers on vascular wall mesenchymal stem cells. *Int Endod J.* 2024 Sep;57(9):1264-1278.
21. 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 Aug 18;11(1):16784.)12
22. Zoch, M.L., Clemens, T.L. & Riddle, R.C. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone.* 82, 42-49 (2016).
23. Kim, J.M. *et al.* G protein-coupled calcium-sensing receptor is a crucial mediator of MTA-induced biological activities, *Biomaterials.* 127, 107-116 (2017).
24. Islam, I., Chng, H.K. & Yap, A.U. Comparison of the Physical and Mechanical Properties of MTA and Portland Cement. *J. Endod.* 32, 193-197 (2006).
25. Paula, A.B. *et al.* Evaluation of dentinogenesis inducer biomaterials: an *in vivo* study. *J. Appl. Oral Sci.* 28, e20190023 (2020).
26. Kim B, Lee YH, Kim IH, Lee KE, Kang CM, Lee HS, Choi HJ, Cheon K, Song JS, Shin Y. Biocompatibility and mineralization potential of new calcium silicate cements. *J Dent Sci.* 2023 Jul;18(3):1189-1198.
27. Bilge K, Ataş O, Yildiz Ş, Çalik I, DüNDAR S, Gezer Ataş A. Histological evaluation of tissue reaction and new bone formation of different calcium silicate-based cements in rats. *Aust Dent J.* 2024 Mar;69(1):18-28.
28. Campi LB, Rodrigues EM, Torres FFE, Reis JMDSN, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Physicochemical properties, cytotoxicity and bioactivity of a ready-to-use bioceramic repair material. *Braz Dent J.* 2023 Jan-Feb;34(1):29-38.
29. Silva ECA, Pradelli JA, da Silva GF, Cerri PS, Tanomaru-Filho M, Guerreiro-Tanomaru JM. Biocompatibility and bioactive potential of NeoPUTTY calcium silicate-based cement: An *in vivo* study in rats. *Int Endod J.* 2024 Jun;57(6):713-726

30. Gilhotra V, Kumar T, Mittal S, Keshav V, Maakhni E, Kesarwani D. Comparative evaluation of various biomaterials as pulpotomy agents in molars with symptomatic irreversible pulpitis: A randomized single-blinded single-center control trial. *J Conserv Dent Endod.* 2024 Oct;27(10):1065-1072.

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO GERAL

CAPÍTULO 5

5.1 DISCUSSÃO GERAL

A busca por cimentos obturadores e reparadores com propriedades biológicas superiores tem sido um dos principais focos de pesquisa desde os anos 1990. O Mineral Trioxide Aggregate (MTA), inicialmente desenvolvido apenas como cimento reparador, demonstrou resultados promissores em diversas pesquisas, especialmente no que diz respeito à biocompatibilidade e bioatividade. Essas características contribuíram para o aumento das taxas de sucesso em tratamentos endodônticos complexos, como perfurações radiculares, reabsorções e cirurgias apicais. Antes da introdução do MTA, materiais como amálgama, ionômero de vidro e Super EBA eram amplamente utilizados em cirurgias apicais, mas careciam da bioatividade necessária para promover uma reparação tecidual efetiva. Com o advento do MTA, esses tratamentos passaram a contar com uma opção mais biocompatível e com resultados mais previsíveis, consolidando o MTA como o material de escolha nesses procedimentos.

O sucesso obtido com o MTA em cirurgias apicais e suas excelentes propriedades biológicas o transformaram em um recurso indispensável para o manejo de complicações endodônticas, como perfurações radiculares e tratamentos regenerativos. A evolução tecnológica permitiu o desenvolvimento de versões aprimoradas do MTA, com partículas menores e a substituição de componentes prejudiciais, o que melhorou ainda mais sua biocompatibilidade. Além de seu uso tradicional como cimento reparador, o MTA também começou a ser sugerido como cimento obturador, levando ao lançamento de vários cimentos à base de MTA no mercado.

Seguindo os passos do MTA, cimentos biocerâmicos, utilizados na medicina desde os anos 1970, começaram a ser propostos para uso em tratamentos endodônticos, prometendo ainda maior biocompatibilidade e bioatividade. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm consistentemente demonstrado que esses materiais apresentam excelente biocompatibilidade e bioatividade, superando algumas limitações do MTA, como sua difícil manipulação e o risco de manchamento da estrutura dentária. Esses avanços permitiram a

popularização dos cimentos biocerâmicos tanto como cimentos obturadores quanto como materiais reparadores na prática endodôntica.

No capítulo 2 deste trabalho, foi demonstrado que o AH Plus® Biocerâmico, um dos novos cimentos biocerâmicos, exibe propriedades biológicas relevantes, com resultados *in vivo* indicando reparo apical e pacientes clinicamente assintomáticos após tratamento de necrose pulpar. A bioatividade e a biocompatibilidade desse material podem torna-lo uma opção promissora para a endodontia moderna.

No capítulo 3, foi apresentado um estudo comparando a viabilidade celular, a capacidade de proliferação e o potencial de mineralização da polpa dentária humana e de células osteoblásticas expostas aos cimentos AH Plus® Biocerâmico, Bio-C® Sealer, NeoMTA Plus® e MTA-FILLAPEX®. As células foram submetidas a ensaios de viabilidade, cicatrização de feridas (*Wound Healing*), atividade da fosfatase alcalina e coloração com vermelho de Alizarina para detecção de cálcio. Os resultados mostraram que as células dos grupos dos cimentos AH Plus® Biocerâmico, Bio-C® Sealer, NeoMTA Plus® foram as mais responsivas, promovendo a maior formação de nódulos mineralizados. Esse desempenho pode justificar a escolha de cimentos à base de silicato de cálcio na prática clínica diária, devido à sua habilidade de promover a reparação tecidual e estimular processos de mineralização.

No capítulo 4, foi observado que as células osteoblásticas do tipo Saos-2 expostos aos cimentos biocerâmicos reparadores apresentou potencial de mineralização. O potencial osteoindutor dos cimentos à base de silicato de cálcio foi diversificado. Os cimentos Bio-C, PBS-HP, ProRoot, NeoMTA-P e MTA-HP induziram rapidamente a diferenciação osteoblástica se credenciado como ideais para procedimentos regenerativos devido à rápida formação de barreiras mineralizadas. Esses achados são relevantes, pois a linhagem de células osteoblásticas humanas Saos-2 utilizada é similar às células expostas aos materiais endodônticos em contextos clínicos, fornecendo uma perspectiva sobre a regeneração óssea, mineralização tecidual e o comportamento desses cimentos na prática clínica.

Em todos os experimentos, os cimentos biocerâmicos demonstraram biocompatibilidade, bioatividade e capacidade de induzir reparação tecidual, com diferentes taxas de indução da diferenciação osteoblástica entre os

materiais. Esse comportamento sugere que os estímulos gerados pelos cimentos biocerâmicos podem iniciar o processo fisiológico de adaptação óssea mediado por osteoblastos, essencial para o sucesso clínico em tratamentos endodônticos, regenerativos e de reparo.

Apesar dos resultados promissores, é fundamental que estudos adicionais sejam realizados para investigar não apenas as propriedades biológicas, mas também as propriedades físico-químicas desses materiais, visando aprimorar suas formulações e disponibilizá-los em suas versões mais eficazes. A constante melhoria dessas propriedades garantirá que esses cimentos biocerâmicos possam continuar a desempenhar um papel central na endodontia moderna, oferecendo opções seguras e eficazes para uma ampla variedade de procedimentos reparadores e regenerativos.

5.2 CONCLUSÕES

As aplicações dos novos cimentos à base de MTA e biocerâmicos na obturação do sistema de canais radiculares, no tratamento de perfurações ou em cirurgias apicais devem-se principalmente às suas propriedades biológicas. A biocompatibilidade e a bioatividade credenciam esses materiais como primeira escolha. Resumidamente, esta tese apresenta estudos que destacam a importância de materiais biocompatíveis e bioativos no tratamento de casos complexos na endodontia. O trabalho sublinha a relevância de estudos que avaliem as propriedades biológicas de materiais endodônticos em diferentes tipos de células, pois esses dados podem orientar a indicação clínica desses materiais e as possíveis reações teciduais a eles. Em ambos os estudos, *in vivo* e *in vitro*, os resultados obtidos com cimentos biocerâmicos comprovaram sua eficácia, biocompatibilidade e bioatividade como cimentos reparadores ou obturadores em endodontia.

CAPÍTULO 6

Press Release

O tratamento endodôntico, conhecido popularmente como tratamento de canal, tem como finalidade tratar a inflamação ou infecção da polpa dentária, geralmente resultante de cáries profundas ou traumas. O procedimento envolve a remoção do tecido pulpar danificado e sua substituição por um material biocompatível, que contribua para a preservação da função estética e mastigatória do dente. Para que isso ocorra com sucesso, os materiais endodônticos devem apresentar biocompatibilidade, durabilidade e, idealmente, promover uma cicatrização eficiente do tecido. Adicionalmente, algumas intercorrências podem ocorrer durante o tratamento endodôntico, principalmente as perfurações radiculares que necessitam de intervenções precisas e com materiais que estimulem a reparação do dano causado.

Ao longo das últimas décadas, diversos materiais foram desenvolvidos para esse propósito. No entanto, com o avanço das tecnologias odontológicas, o MTA e os cimentos biocerâmicos surgiram como alternativas promissoras, devido às suas propriedades biológicas e potencial de reparação tecidual. Este estudo avaliou, por meio de experimentos *in vitro*, as características biológicas de novos cimentos biocerâmicos reparadores e obturadores utilizados tanto para obturação quanto para reparo, evidenciando propriedades favoráveis para sua aplicação clínica na endodontia.

Além disso, uma revisão detalhada da literatura sobre o cimento AH Plus biocerâmico foi realizada, incluindo três casos clínicos bem-sucedidos, nos quais foi observada uma reparação tecidual significativa em um curto intervalo de tempo após o uso desse material. Os resultados clínicos e laboratoriais obtidos demonstram o impacto positivo dos cimentos biocerâmicos na resposta biológica das células pulpares e ósseas, reforçando seu potencial bioativo.

Os dados apresentados fornecem uma base científica sólida para auxiliar profissionais na escolha dos materiais mais adequados para a terapia endodôntica, com o objetivo de otimizar a regeneração tecidual e a funcionalidade do dente tratado. Esses resultados corroboram a crescente relevância dos cimentos biocerâmicos na prática clínica odontológica.

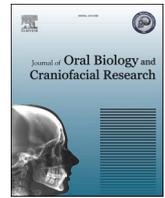
ANEXOS

*Trabalhos publicados ou submetidos a jornais científicos e CEP do isolamento de células pulpares para estudos *in vitro* de propriedades de novo material endodôntico



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Oral Biology and Craniofacial Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jobcr

Comparative analysis of viability, proliferation, and mineralization potential of human pulp and osteoblastic cells exposed to different bioceramic endodontic sealers

Marcos Coelho Santiago^a, Gustavo Henrique de Oliveira Salles^b, Gustavo Gomes de Lima^a,
Laudimar Alves de Oliveira^a, Loise Pedrosa Salles^{a,*}

^a University of Brasília, Faculty of Health Sciences, Post-Graduation Program in Dentistry, Brasília, DF, Brazil

^b University of Planalto Central, Medical School, Brasília, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Calcium silicate
Dental materials
Dental pulp
Endodontics
Osteoblasts
Root canal obturation

ABSTRACT

Background: The present study aimed to compare the viability, proliferation, and mineralization potential of human dental pulp cells (hDPCs) and osteoblasts cell line (Saos-2) after exposure to AH Plus® Bioceramic (AHP-B), Bio-C® Sealer (BIO-C), NeoMTA Plus® (NEOMTA-P), and MTA-FILLAPEX® endodontic sealers (MTA-F).

Methods: All materials were prepared according to the manufacturer's instructions. Before exposing the cells, we measured the release of calcium ions (Ca²⁺) from the dental materials to the culture media once Ca²⁺ can trigger signaling pathways. After that, hDPCs and Saos-2 were exposed to the sealers for MTT assay to assess the cell viability and wound healing to evaluate the cell proliferation. To investigate the potential of mineralization, we assessed the alkaline phosphatase activity and calcium deposition by Alizarin red staining. Statistical analysis was performed using Two-way ANOVA for calcium release and wound healing assays and One-way ANOVA for other assays, with post-test Bonferroni correction. The results were significant when $p < 0.05$.

Results: The sealers released diverse concentrations of calcium at different times. The hDPCs viability and proliferation were low in the AHP-B group at 24h of exposure (NEOMTA-P ~ BIO-C ~ CT > AHP-B > MTA-F), distinct from the osteoblastic cells (NEOMTA-P ~ AHP-B ~ CT > BIO-C > MTA-F) and (proliferation: AHP-B > NEOMTA-P ~ CT > BIO-C > MTA-F). The ALP activity, an early marker of osteogenesis, was higher in hDPCs exposed to NEOMTA-P, while the osteoblastic cells showed higher ALP when exposed to AHP-B.

Conclusion: AHP-B, NEOMTA-P, and BIO-C stimulated osteogenesis in hDPCs and Saos-2 cells, with marked differences between groups. AHP-B showed an improved early stimulation of osteoblastic cells, while hDPCs were more responsive to NEOMTA-P.

1. Introduction

Endodontic sealers play a crucial role in the success of root canal therapy by providing a tight seal between the root canal filling material and the canal walls, preventing bacterial infiltration and promoting the healing of the surrounding tissues.¹ These materials must ensure biological and mechanical properties, such as biocompatibility, adaptability to canal irregularities, and dimensional stability.¹ The ideal sealer should promote tissue regeneration and minimize adverse reactions when in contact with periapical tissues.² One endodontic material recognized with impressive biological properties is the mineral

trioxide aggregate (MTA), composed of calcium silicates. Over the years, the excellence of MTA for tissue repair has stimulated the development of root canal sealers with calcium silicates as the main component.³ The improvement in sealer's composition with dicalcium silicate and tricalcium silicate nanoparticles, more biocompatible radiopacifying agents, such as zirconium oxide, and removal of heavy metals has culminated in the latest generations of endodontic sealers.⁴ According to the excellent biological properties, the peers named this class of material bioceramic.³

A bioceramic sealer primarily comprises calcium phosphate, calcium silicate, glass ceramics, aluminum, and zirconia, contributing to

* Corresponding author. University of Brasília (UnB), Faculty of Health Sciences, Department of Dentistry. Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF, 70910-900, Brazil.

E-mail address: loise@unb.br (L.P. Salles).

<https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2025.01.008>

Received 8 July 2024; Received in revised form 24 November 2024; Accepted 5 January 2025

2212-4268/© 2025 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of Craniofacial Research Foundation. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

superior properties such as biocompatibility and osteogenic potential.^{4–6} Currently, various root canal sealers based on calcium silicate are available. One of the newest is AH Plus Bioceramic (AHP-B), which has a composition different from that of other commonly used bioceramics. Unlike its competitors, AHP-B contains fewer silicates than other ready-to-use bioceramics such as Bio-C sealer (Bio-C) and NeoMTA Plus (NEOMTA-P).⁷ Additionally, AH Plus Bioceramic contains only tricalcium silicates and includes dimethyl sulfoxide (DMSO) in its formulation. DMSO, an FDA-approved organosulfur solvent, has been reported to have therapeutic value in osteoarthritis and osteopenia. Studies have shown that DMSO can enhance osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells and prevent bone loss by inhibiting osteoclast activity.⁸

Another curious component of AH Plus Bioceramic is lithium carbonate. Lithium and carbonate groups naturally occur in hydroxyapatite (HA) within mineralized tissue of the human body.⁹ Lithium can reduce the solubility of HA, increase thermal stability compared with other cations, and enhance toughness, osteogenesis, bioactivity, and strength.¹⁰ However, high concentrations of lithium ions in the serum can be toxic.¹¹ Therefore, the effects of lithium and DMSO on this new material's biological properties must be carefully evaluated.¹¹ Moreover, AH Plus Bioceramic contains a higher proportion of the zirconia radiopacifier (50 %–70 %), which could interfere with its biological activity when exposed to periapical tissues.¹²

Despite the growing interest in bioceramic sealers, literature comparing the biocompatibility and bioactivity of AHP-B with other bioceramic sealers still needs to be explored. One study demonstrated that AH Plus Bioceramic and Endosequence BC similarly induced gene expression and formation of calcified nodules in human periodontal ligament stem cells.¹³ However, further studies are needed to evaluate its biocompatibility and mineralization potential comprehensively. Therefore, this study aimed to comparatively evaluate the biocompatibility and mineralization potential of the AH Plus® Bioceramic Sealer (AHP-B) with Bio-C® Sealer (Bio-C), NeoMTA Plus® (NEOMTA-P), and MTA-FILLAPEX (MTA-F) in cultures of human dental pulp cells (hDPCs) and osteoblastic cells.

2. Methods

2.1. Isolation and culture of human dental pulp cells (hDPCs)

The isolation of human dental pulp cells (hDPCs) was approved by the Ethics Committee on Human Research (UnB-FS/CEP no. 23852219.9.0000.0030) and conducted following the ethical principles outlined in the Helsinki Declaration. Pulp samples were collected from the third molars of patients over 18. The tissue was initially placed in a Petri dish containing Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), 100 IU/mL ampicillin, and 100 µg/mL streptomycin for transport to the laboratory (ALL SOLUTIONS GIBCO, GRAND ISLAND, NY). The tissue was washed twice in DPBS 1X, then minced and incubated in trypsin/EDTA (0.25 %) for approximately 5 min maximum. EDTA, a chelating agent, improves the ability of trypsin to detach adherent cells by binding to calcium (Ca²⁺) and magnesium (Mg²⁺) ions in the extracellular matrix, weakening cell-cell adhesion. Therefore, the cells easily migrate from the tissue fragment to the bottom of the wells as an explant. The culture plates are composed of cell-culture-treated polystyrene, and the surface of the well's bottom is treated with proprietary Nunclon Delta surface; the T-75 flasks have the same treatment, which supports optimal growth and attachment of cells to the growth surface. The cell fragments were transferred to Eppendorf tubes with culture media and centrifuged at 4000 rpm for 3 min. After centrifugation, the pellets of tissue fragments were suspended in fresh media, and the sediment was distributed into 12-well plates with DMEM and incubated at 37 °C, 95 % humidity, and 5 % CO₂.¹⁴ Once the cells reached confluence, they were detached using trypsin/EDTA, transferred to T-25 flasks, and sub-cultured at the

described conditions. Once confluent, the cells were detached using trypsin/EDTA one more time and maintained in T-75 flasks (ALL PLATES AND FLASKS, CORNING, UNION CITY, CA). For the experiments, the cells were plated at a density of 2 × 10⁴ cells per well in 12-well plates (CORNING, UNION CITY, CA) and incubated under the same conditions described above.

2.2. Culture of Saos-2

Human osteoblastic cells (Saos-2, ATCC HTB-85) were cultured as monolayers in T-75 flasks (CORNING, UNION CITY, CA) containing DMEM at 37 °C, 95 % humidity, and 5 % CO₂. The adhered cells were detached with trypsin/EDTA (0.25 %) at 37 °C for 2 min. The collected cells were placed in 12-well plates (CORNING, UNION CITY, CA) at a density of 2 × 10⁴/well and incubated under the same conditions described for 24 h before exposure to the materials.¹⁵

2.3. Sealers preparation

The AHP-B, Bio-C, NEOMTA-P, and MTA-F sealers were prepared according to the manufacturers' recommendations. The commercial name, composition, setting time, and percentage of calcium silicate content of each sealer are summarized in Table 1. The sealers were mixed and placed into polypropylene molds (3 × 5mm) for sample preparation. The molds were incubated at 37 °C, 95 % humidity, and 5 % CO₂ for 72 h to allow the materials to set completely. After the setting period, the hardened sealer samples were carefully transferred into transwell devices containing 0.4 µm permeable membranes (CORNING, UNION CITY, CA). These devices were used to expose the samples to Saos-2 cells (osteoblastic lineage) and human dental pulp cells (hDPCs) in the corresponding experimental setups.

2.4. Calcium ion measurement (Ca²⁺)

After 72 h of setting, the materials samples were immersed in 12-well plates (CORNING, UNION CITY, CA) containing 1.5 mL of DMEM at 37 °C, 95 % humidity, and 5 % CO₂. The concentration of calcium was determined in parts per million (ppm) with the portable LAQUAtwin Ca-11 calcium meter (HORIBA, SÃO PAULO, SP, BRAZIL). Each measurement and device calibration followed the manufacturer's recommendations. We collected 500 µL of the medium and inserted it into the equipment for measurement at 1, 3, 24, 72, and 96 h. The data were transferred to an Excel spreadsheet (OFFICE 2007, MICROSOFT CORPORATION, REDMOND, WA). The experiment was repeated three times independently (n = 9/group).

2.5. MTT assay

After exposure to each material for 24 h, the medium was changed to DEMEM containing 0.55 mg/mL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (SIGMA CHEMICALS, ST LOUIS, MO, USA) without FBS and the plates were re-incubated for four additional hours. After that time, the formazan crystals were solubilized in 500 µL of acidified isopropanol (HCl: isopropanol, 0.04N), and 100 µL of the sample's solutions were transferred to a 96-well plate (CORNING, UNION CITY, CA). The optical density was measured at 570 nm (ELX800, BIOTEK INSTRUMENTS, WINOOSKI, VT), and the experiment was in triplicates (n = 9/group).

2.6. Wound healing assay

Along the bottom of each well of cell culture, about 95 % confluent, we made a 500 µm-wide wound using a sterile P-10 pipette's point. Then, we placed the transwells with sealer samples in the plates for cell exposure. Every 24 h, 30 fields were photographed per group (n = 30/group) using the Zeiss Axiovert 100 inverted microscope (ZEISS,

Table 1

Commercial name, composition, presentation, manufacturer, setting time, and percentage of silicates.

Commercial name	Composition	Presentation	Manufacturer	Setting time % of silicates
AH Plus®Bioceramic Sealer	Zirconium dioxide, Tricalcium silicate, Dimethylsulfoxide, Lithium carbonate, Thickening agent	"Ready to use"	Dentsply Sirona, Charlotte, USA	120min 5%–15% ¹³
Bio-C® Sealer	Tricalcium silicate, dicalcium silicate, tricalcium aluminate, calcium oxide, zirconium oxide, silicon oxide, polyethylene glycol and iron oxide ⁸	"Ready to use"	Angelus Londrina, PR, Brazil	240min 65 % ^a
NeoMTAPlus®	Dust: Tricalcium silicate, Dicalcium silicate, tantalum oxide, tricalcium aluminate, calcium sulfate. Liquid: Water-based gel and thickening agents and water-soluble polymers ³	powder and gel	Avalon Biomed Houston, TX, USA	130min 72 % ^a
MTA-FILLAPEX	paste A: salicylate resin, calcium tungstate, fumed silica. paste B: Fumed silica, titanium dioxide, Mineral trioxide aggregate and resin base ³	paste-paste	angelus Londrina, PR, Brazil	100min 13 % ^a

^a Manufacturer information.

GERMANY, JENA). Thirty fields per group were used in wound healing assays based on statistical sample size calculation to ensure sufficient power to detect meaningful differences with the ANOVA statistical test. The microscopic images were digitized to calculate the percentage of area covered by cells using the ImageJ 1.52K Software (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, NIH, BETHESDA, MARYLAND, USA).

2.7. Alkaline phosphatase assay (ALP)

After five days of exposure, the cells were washed with phosphate buffer (PBS 1X) and immersed in 1 mL of sodium lauryl sulfate (1 mg/mL; SLS, SIGMA CHEMICALS, ST LOUIS, MO) for 30min at room temperature without agitation. Aliquots of each sample (50 µL) were added to the ALP kit components according to the manufacturer's instructions (LABTEST, LAGOA SANTA, MG, BRAZIL). The absorbance was measured at 590 nm (ELx800, Biotek Instruments). We repeated the experiment three times independently (n = 9/group). The ALP was expressed as µmol of thymolphthalein/min/L normalized by the OD of viable cells (570 nm).

2.8. Alizarin Red S staining (ARS)

After 15 days of exposure, the cell's monolayers were washed three times with 1X PBS and fixed in 10 % formaldehyde (SIGMA CHEMICALS, ST LOUIS, MO, USA) at room temperature for 15 min. The monolayers were washed twice with distilled water (dH₂O), and then we added 1 mL of 2 % ARS (pH 4.1) per well (n = 9/group). We incubated the plates at room temperature for 20 min for staining. After that, the wells were washed five times with 2 mL dH₂O. The stained nodules were microscopically observed and photographed (ZEISS AXIOVERT 100, GERMANY, JENA) with 20x magnification. The calculation of the ARS area followed the ImageJ 1.45 protocol (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, NIH, USA).

2.9. Statistical analysis

The Shapiro-Wilk test was performed to assess the normality of the data, which showed normal distribution for all variables. The data were exported to Excel spreadsheets (OFFICE 2007, MICROSOFT CORPORATION, REDMOND, WA) and subjected to statistical analysis: one-way and two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni post-test, with p < 0.05 considered significant. The two-way analysis of variance was used to evaluate the calcium release and the wound healing data according to the levels of "exposure time" and "materials group" as independent variables, and the other results were analyzed using the one-way ANOVA. Sample size calculations were established using the means and within-group variance based on results from other studies^{15,16} with an alpha of 5 % and 80 % power ("F test for group effect" and "F test for row effect" considering one-way ANOVA and two-way ANOVA, respectively). The studies were performed using

STATA/IC 15.1 (STATA CORP, COLLEGE STATION, TX, USA).

3. Results

3.1. Calcium ions release

At 1 h, the MTA-F, Bio-C, and AHP-B groups showed a decrease of calcium in DMEM with values significantly lower than CT (~97.3 ppm) (Table 2). Oppositely, the NEOMTA-P group had a significant increase of calcium at one (~160.3 ppm) and 3 h (~168.33 ppm). The AHP-B bit the calcium concentration in samples only at 72h (~154.10 ppm), which remained significantly higher than the other groups in 96h of incubation (AHP-B > NEOMTA-P ~ Bio-C > CT > MTA-F). The Bio-C and NEOMTA-P groups reached similar calcium concentration levels at 72h (~118 ppm and ~120 ppm) and were significantly higher than CT. The MTA-F group showed the lowest calcium release throughout the study. Statistics: One-way ANOVA and Bonferroni posthoc, mean ± SD, p < 0.05 (Table 3).

3.2. Cell viability

After 24 h of exposure to the AHP-B sealer, the viability of human dental pulp cells (hDPCs) was significantly lower (~84.11 %) compared to the NEOMTA-P, Bio-C, and control (CT) groups, which showed viability rates of approximately ~98.51 %, ~93.92 %, and ~100.01 %, respectively (Fig. 1a). In contrast, osteoblastic Saos-2 cells exposed to AHP-B (~97 %) and NEOMTA-P (~90 %) demonstrated viability rates comparable to the control group (~102 %) (Fig. 1b). The viability of Saos-2 cells exposed to Bio-C (~78 %) was significantly lower than that of the CT group. Additionally, both hDPCs and Saos-2 cells exposed to MTA-F exhibited the lowest viability rates among all groups.

3.3. Cell proliferation

After 24 h of exposure, the AHP-B group showed approximately 35 % wound coverage by hDPCs, significantly lower than the NEOMTA-P, Bio-C, and control (CT) groups, which exhibited near 80 % coverage (Fig. 1c). At 48 h, the statistical difference between AHP-B and the other groups persisted: the CT and NEOMTA-P groups achieved nearly 100 % wound closure, Bio-C covered about 95 %, while AHP-B reached only ~77 %. At 48 h, only NEOMTA-P and CT entirely covered the wound area, whereas AHP-B remained at a lower level of coverage.

In contrast, the percentage of wound area covered by Saos-2 cells after 24 h of exposure to AHP-B was significantly higher (~37.09 %) compared to NEOMTA-P (~16.62 %) and Bio-C (~5.82 %) (Fig. 1d). By 48 h, both AHP-B (~88.7 %) and NEOMTA-P (~87.5 %) groups showed similar cell coverage, with the CT group achieving ~100 % wound closure. The Bio-C group, however, exhibited significantly lower coverage (~70 %). Notably, except for the MTA-F group, hDPCs and Saos-2 cells in the AHP-B, NEOMTA-P, and Bio-C groups remained

Table 2
Comparison of Calcium Concentrations (Ca²⁺, ppm) in the Culture Media After Sealer Incubation.

	0h ppm ± SD	1 h/ppm ± SD	3h ppm ± SD	24 h ppm ± SD	72 h ppm ± SD	96 h ppm ± SD
CT	97.8 ± 0,4923 ^{a,A*}	97.3 ± 0,4923 ^{a,A*}	99.1 ± 0,4923 ^{a,A*}	98.7 ± 0,4923 ^{a,A*}	93.1 ± 0,5149 ^{a,B*}	88.2 ± 0,7177 ^{a,B*}
MTA-F	97.9 ± 0,4923 ^{a,A*}	81.6 ± 0,7177 ^{b,B*}	76.6 ± 0,5222 ^{b,D*}	29.1 ± 0,7784 ^{b,G*}	15.9 ± 0,5222 ^{b,J*}	11.3 ± 0,6030 ^{b,K*}
NEOMTA-P	98.0 ± 0,4082 ^{a,A*}	160.3 ± 0,5163 ^{c,C*}	168.3 ± 1,0327 ^{c,C*}	130.1 ± 0,6324 ^{c,H*}	120.5 ± 0,8366 ^{c,I*}	120.9 ± 0,5163 ^{c,I*}
BIO-C	98.1 ± 0,5222 ^{a,A*}	81.1 ± 0,4922 ^{b,B*}	110.7 ± 0, ^{9847d,E*}	118.2 ± 0,4923 ^{d,I*}	118.1 ± 0,4923 ^{c,I*}	119.2 ± 0,9847 ^{c,I*}
AHP-B	97.9 ± 0,5477 ^{a,A*}	83.6 ± 1,0327 ^{b,B*}	92.2 ± 1,1690 ^{e,F*}	97.6 ± 1,2649 ^{a,A*}	154.1 ± 4,0496 ^{d,C*}	141.6 ± 1,9407 ^{d,L*}
Source of variation	SS	d.f.	MS	F	p-value	F crit
Factor #1 (material)	275.786,18399	5	55.157,23680	4.015,27602	0,00000	2,23684
Factor #2 (time)	14.220,41080	5	2.844,08216	207,04037	0,00000	2,23684
Factor #1 + #2 (material x time)	195.619,48000	25	7.824,77920	569,61969	0,00000	1,53401
Within groups	5.426,05500	395	13,73685			
Total	491.052,12979	430	1.141,98170			
Omega squared for combined effect	0,98794					

*Lowercase letters indicate differences between groups within the same time point. Uppercase letters indicate group differences across time points (P < 0.05).

confluent and exhibited normal morphology in the area surrounding the wound (Fig. 1e). Despite the differences in proliferation rates, cells from these groups were attached and displayed typical morphology (100 µm scale bars) (Fig. 1e). Conversely, most cells exposed to MTA-F detached and exhibited abnormal shapes. Cell viability was analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc tests (P < 0.05).

3.4. Alkaline phosphatase activity

Alkaline phosphatase (ALP) activity in hDPCs exposed to NEOMTA-P (~153.2 thymolphthalein/min/L/OD) was the highest, followed by AHP-B (~135.7 thymolphthalein/min/L/OD) and Bio-C (~134.2 thymolphthalein/min/L/OD), which were statistically similar (Fig. 2a). All hDPC groups exhibited significantly higher ALP activity compared to the control (CT) group (~126.4 thymolphthalein/min/L/OD).

In osteoblastic cells, ALP activity was also significantly higher in the AHP-B (~2434.2 thymolphthalein/min/L/OD), NEOMTA-P (~2224.3 thymolphthalein/min/L/OD), and Bio-C (~2104.5 thymolphthalein/min/L/OD) groups compared to CT (~1656.6 thymolphthalein/min/L/OD) (Fig. 2b). The MTA-F group exhibited the lowest ALP activity in both hDPCs and Saos-2 cells. After five days of exposure to the sealers, ALP activity in both hDPCs and Saos-2 cells was significantly higher than in the CT group, except for MTA-F. The hDPCs exposed to NEOMTA-P showed the highest ALP activity (Fig. 2a), while AHP-B induced the highest ALP activity in Saos-2 cells (Fig. 2b).

3.5. Mineralization

hDPCs exposed to AHP-B (~78.41 %), NEOMTA-P (~86.79 %), and Bio-C (~77.22 %) in an osteogenic medium for 15 days demonstrated robust Alizarin Red S (ARS) staining and a significantly higher percentage of mineralized areas compared to the control (CT) group (~10.7 %) (Fig. 3a and c). The MTA-F group exhibited a significantly lower mineralized area (~31.3 %) than the other groups, with values similar to the CT group (~10.7 %). A similar pattern of ARS staining was observed in Saos-2 cells, with NEOMTA-P (~82.23 %), AHP-B (~79.05 %), and Bio-C (~78.39 %) showing significantly greater mineralized areas compared to CT (~67 %) (Fig. 3b). In contrast, the MTA-F group displayed the lowest mineralized area (~2.21 %), along with fewer surviving cells (Fig. 3c).

4. Discussion

In this study, the bioceramic sealers differently affected hDPCs and Saos-2. When placed within the root canal, the materials employed in endodontic treatment should strive to maintain minimal contact with periradicular tissues. Nevertheless, throughout the treatment, there is a possibility of these sealers extravasating through the apical foramina,

lateral canals, or accessory canals, which may still contain vital pulp cells, potentially impacting the tissues to varying extents.¹² Hence, the sealer must not induce harm to these tissues or hinder the tissue healing process.¹⁷ The sealer's composition is likely responsible for the cellular behavior, especially AHP-B, which has lithium carbonate, dimethyl sulfoxide (DMSO), and less tricalcium silicate. Lithium is an osteoprotective agent that activates signaling pathways, such as the BMP-2 (bone morphogenetic protein-2), Wnt/β-catenin (Wingless/beta-catenin), and PI3K/Akt (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B).¹⁸ DMSO enhances the absorption of other compounds across cell membranes, increasing their effectiveness¹⁹ and the bioavailability of calcium.²⁰

Interestingly, MTA-F, AHP-B, and BIO-C groups showed an immediate decrease in media calcium (Ca²⁺) at 1h of incubation. The balance between the sealer hydration and its concentration of calcium silicates (CaSi) may explain this result.²¹ During the early stages of hydration, the sealer forms a thin layer of byproducts on its surface, which adsorb or react with Ca²⁺ from the media, reducing Ca²⁺ in the supernatant.²² Different from the other sealers, NEOMTA-P has the highest content of CaSi (NEOMTA-P, 72 % > BIO-C, 65 % > AHP-B, 15 % > MTA-F, 13 %; Table 1) and leached a significant amount of Ca²⁺ already at the first hours of immersion in the culture media. NEOMTA-P showed a solubility of ~9 % and a Ca²⁺ release of 126 ppm after 24 h of incubation in deionized water.^{23,24} In our study, BIO-C released an increased concentration of Ca²⁺ at 3 h of incubation and sustained a release of over 110 ppm until 96 h in DMEM. In a different study, BIO-C solubility was ~11.4 %, ²⁵ and this sealer released 157.3 ppm of Ca²⁺ after 24 h in DMEM,²⁴ corroborating our results. In the AHP-B group, the Ca²⁺ concentration started to increase at 3h, the Ca²⁺, reaching a high concentration at 72h, which may correlate with the sealer solubility during the prolonged setting time and Ca²⁺ release to the media from 24 to 72 h.^{21,22} In a study of physical-chemical analysis,²² the AHP-B release of calcium was similar to our research (~30.6 ppm at 24 h of immersion in distilled water and a peak of ~67.5 ppm at 72 h). The authors attributed this result to the low percentages of tricalcium silicate and the overall AHP-B composition. According to them, “the ion release depends on the nature of the network structure of the sealer responsible for water absorption and solubility as well as the permeability of the material to water diffusion”.²² The sealer composition may lead to a high volume of open pores; consequently, this material can absorb more water, show higher solubility, and potentially release higher ions depending on the content of reactive CaSi particles.²² In that study, AHP-B, the sealer with the lowest proportion of calcium silicate, showed higher solubility, open pore volume, and water absorption than AH Plus, Ceraseal, and Neo-Sealer Flo. MTA-F showed a progressive decrease of Ca²⁺ in the media until 96h. Possibly, MTA-F adsorbed Ca²⁺ from the culture media during the entire experiment. The solubility of MTA-F is still controversial.²⁶ The decrease of Ca²⁺ at 96h that NEOMTA-P, BIO-C, and AHP-B showed possibly correlates with the sealer complete set.

Table 3Comparison of calcium concentrations between groups using the bonferroni post hoc test ($P < 0.05$).

0h						
Group vs. Group (Contrast)	Difference	95 % Confidence Interval		Test Statistic	p-value	Significance
AHP-B vs BIO-C	-0,04167	-4,50817	4,42484	0,02754	1,00000	Not Significant
AHP-B vs CT	-0,15833	-4,62484	4,30817	0,10464	1,00000	Not Significant
AHP-B vs MTA-F	-0,05833	-4,52484	4,40817	0,03855	1,00000	Not Significant
AHP-B vs NEOMTA-P	-0,37500	-4,94189	4,19189	0,24239	1,00000	Not Significant
BIO-C vs CT	-0,11667	-4,58317	4,34984	0,07710	1,00000	Not Significant
BIO-C vs MTA-F	-0,01667	-4,48317	4,44984	0,01101	1,00000	Not Significant
BIO-C vs NEO	-0,33333	-4,90022	4,23356	0,21546	1,00000	Not Significant
CT vs MTA-F	0,10000	-4,36651	4,56651	0,06609	1,00000	Not Significant
CT vs NEOMTA-P	-0,21667	-4,78356	4,35022	0,14005	1,00000	Not Significant
MTA-F vs NEOMTA-P	-0,31667	-4,88356	4,25022	0,20468	1,00000	Not Significant
1h						
Group vs. Group (Contrast)	Difference	95 % Confidence Interval		Test Statistic	p-value	Significance
AHP-B vs BIO-C	2,48333	-1,98317	6,94984	1,64122	1,00000	Not Significant
AHP-B vs CT	-14,31667	-18,78317	-9,85016	9,46180	0,00000	Significant
AHP-B vs MTA-F	1,99167	-2,47484	6,45817	1,31628	1,00000	Not Significant
AHP-B vs NEOMTA-P	-77,19167	-81,65817	-72,72516	51,01554	0,00000	Significant
BIO-C vs CT	-16,80000	-21,26651	-12,33349	11,10303	0,00000	Significant
BIO-C vs MTA-F	-0,49167	-4,95817	3,97484	0,32494	1,00000	Not Significant
BIO-C vs NEO	-79,67500	-84,14151	-75,20849	52,65676	0,00000	Significant
CT vs MTA-F	16,30833	11,84183	20,77484	10,77809	0,00000	Significant
CT vs NEOMTA-P	-62,87500	-67,34151	-58,40849	41,55374	0,00000	Significant
MTA-F vs NEOMTA-P	-79,18333	-83,64984	-74,71683	52,33182	0,00000	Significant
3h						
Group vs. Group (Contrast)	Difference	95 % Confidence Interval		Test Statistic	p-value	Significance
AHP-B vs BIO-C	-19,50000	-23,96651	-15,03349	12,88744	0,00000	Significant
AHP-B vs CT	-7,88333	-12,34984	-3,41683	5,21005	4,42488E-6	Significant
AHP-B vs MTA-F	14,60000	10,13349	19,06651	9,64906	0,00000	Significant
AHP-B vs NEOMTA-P	-77,20833	-81,67484	-72,74183	51,02656	0,00000	Significant
BIO-C vs CT	11,61667	7,15016	16,08317	7,67739	1,68937E-12	Significant
BIO-C vs MTA-F	34,10000	29,63349	38,56651	22,53650	0,00000	Significant
BIO-C vs NEO	-57,70833	-62,17484	-53,24183	38,13911	0,00000	Significant
CT vs MTA-F	22,48333	18,01683	26,94984	14,85911	0,00000	Significant
CT vs NEOMTA-P	-69,32500	-73,79151	-64,85849	45,81650	0,00000	Significant
MTA-F vs NEOMTA-P	-91,80833	-96,27484	-87,34183	60,67561	0,00000	Significant
24h						
Group vs. Group (Contrast)	Difference	95 % Confidence Interval		Test Statistic	p-value	Significance
AHP-B vs BIO-C	-20,56667	-25,62507	-15,50826	13,59239	0,00000	Significant
AHP-B vs CT	-1,09167	-6,15007	3,96674	0,72148	1,00000	Not Significant
AHP-B vs MTA-F	68,46667	63,40826	73,52507	45,24924	0,00000	Significant
AHP-B vs NEOMTA-P	-32,54167	-37,60007	-27,48326	21,50661	0,00000	Significant
BIO-C vs CT	19,47500	14,41660	24,53340	12,87092	0,00000	Significant
BIO-C vs MTA-F	89,03333	83,97493	94,09174	58,84163	0,00000	Significant
BIO-C vs NEO	-11,97500	-17,03340	-6,91660	7,91421	0,00000	Significant
CT vs MTA-F	69,55833	64,49993	74,61674	45,97071	0,00000	Significant
CT vs NEOMTA-P	-31,45000	-36,50840	-26,39160	20,78513	0,00000	Significant
MTA-F vs NEOMTA-P	-101,00833	-106,06674	-95,94993	66,75584	0,00000	Significant
72h						
Group vs. Group (Contrast)	Difference	95 % Confidence Interval		Test Statistic	p-value	Significance
AHP-B vs BIO-C	35,98333	30,92493	41,04174	23,78118	0,00000	Significant
AHP-B vs CT	61,06667	56,00826	66,12507	40,35862	0,00000	Significant
AHP-B vs MTA-F	138,18333	133,12493	143,24174	91,32459	0,00000	Significant
AHP-B vs NEOMTA-P	33,49167	28,43326	38,55007	22,13446	0,00000	Significant
BIO-C vs CT	25,08333	20,61683	29,54984	16,57743	0,00000	Significant
BIO-C vs MTA-F	102,20000	97,73349	106,66651	67,54341	0,00000	Significant
BIO-C vs NEO	-2,49167	-6,95817	1,97484	1,64673	1,00000	Not Significant
CT vs MTA-F	77,11667	72,65016	81,58317	50,96597	0,00000	Significant
CT vs NEOMTA-P	-27,57500	-32,04151	-23,10849	18,22416	0,00000	Significant
MTA-F vs NEOMTA-P	-104,69167	-109,15817	-100,22516	69,19014	0,00000	Significant
96h						
Group vs. Group (Contrast)	Difference	95 % Confidence Interval		Test Statistic	p-value	Significance
AHP-B vs BIO-C	22,43333	17,96683	26,89984	14,82606	0,00000	Significant
AHP-B vs CT	53,41667	48,95016	57,88317	35,30278	0,00000	Significant
AHP-B vs MTA-F	130,25833	125,79183	134,72484	86,08700	0,00000	Significant
AHP-B vs NEOMTA-P	20,69167	16,22516	25,15817	13,67501	0,00000	Significant
BIO-C vs CT	30,98333	26,51683	35,44984	20,47671	0,00000	Significant
BIO-C vs MTA-F	107,82500	103,35849	112,29151	71,26094	0,00000	Significant
BIO-C vs NEO	-1,74167	-6,20817	2,72484	1,15106	1,00000	Not Significant
CT vs MTA-F	76,84167	72,37516	81,30817	50,78423	0,00000	Significant
CT vs NEOMTA-P	-32,72500	-37,19151	-28,25849	21,62777	0,00000	Significant
MTA-F vs NEOMTA-P	-109,56667	-114,03317	-105,10016	72,41200	0,00000	Significant

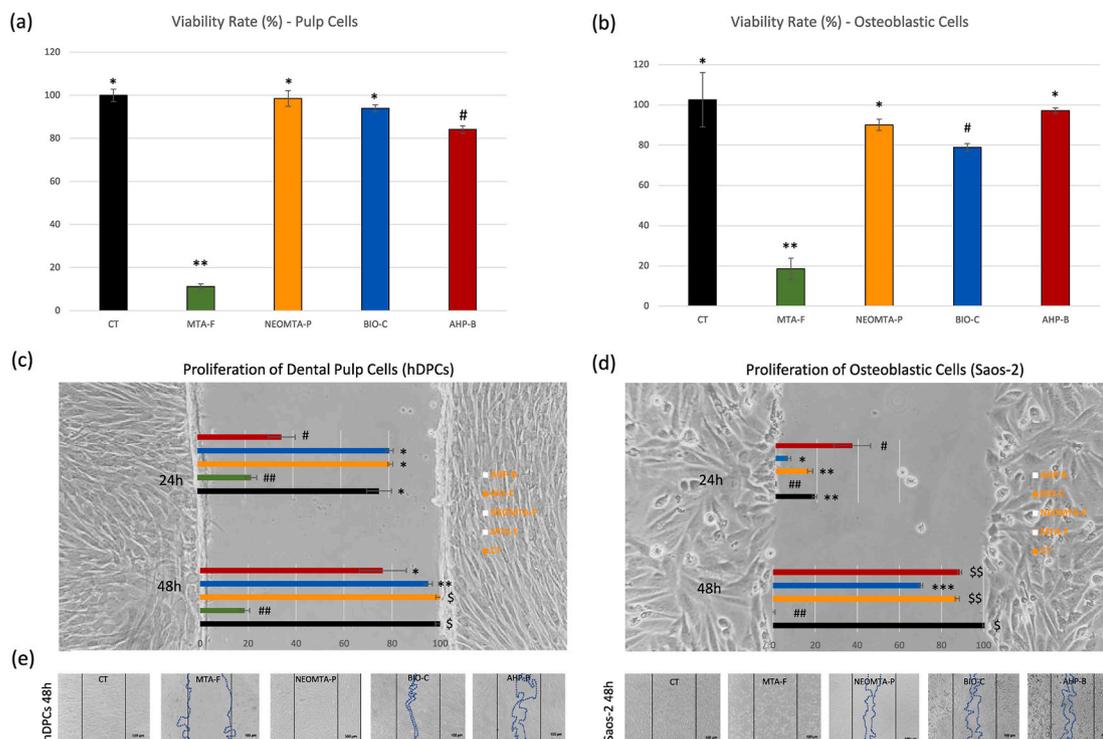


Fig. 1. Cellular viability and proliferation towards the wound of hDPCs and Saos-2 exposed to NEOMTA-P, BIO-C, AHP-B, and MTA-F. **Statistics:** one-way and two-way ANOVA, followed by Bonferroni post-hoc tests. The material type and exposure time were significant factors in the two-way ANOVA of the wound healing assay. Statistical differences between groups are indicated by different symbols (mean ± SD, $p < 0.05$).

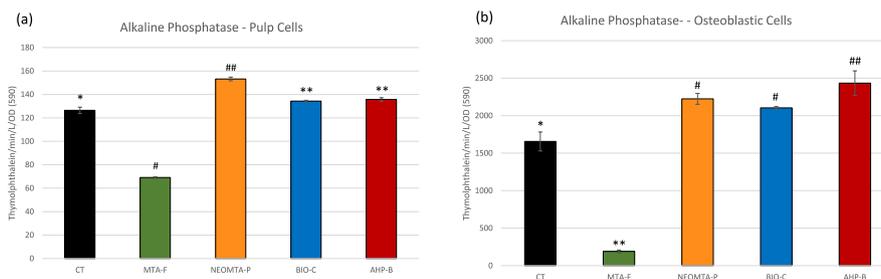


Fig. 2. Alkaline phosphatase activity (ALP) of human dental pulp cells (hDPCs) and osteoblastic cells (Saos-2) exposed to AHP-B, NEOMTA-P, BIO-C, and MTA-F. **Statistics:** One-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc tests. Different symbols represent statistically significant group differences (mean ± SD, $p < 0.05$).

After 24 h of exposure, all sealers proved to be biocompatible with both hDPCs and Saos-2, with the exception of MTA-F. The hDPCs and Saos-2 cells exhibited approximately 100 % viability after being exposed to NEOMTA-P, which had previously demonstrated an absence of cytotoxicity in another study involving dental pulp stem cells.²⁷ However, the viability rate of hDPCs exposed to AHP-B was significantly lower at around 80 %, while Saos-2 cells maintained approximately 100 % viability. Conversely, exposure to BIO-C resulted in hDPCs displaying around 100 % viability, whereas Saos-2 cells showed a viability rate of approximately 78 %. The longer setting times noted for both AHP-B and BIO-C may contribute to increased solubility and a higher release of sealer compounds, particularly resinous compounds, which could lead to cytotoxicity and adversely affect cell viability.²⁸ Both AHP-B and BIO-C exhibited mild initial cytotoxicity towards human periodontal ligament fibroblasts.²⁸ Despite the lower viability rates of hDPCs exposed to AHP-B and Saos-2 cells exposed to BIO-C, most cells retained normal morphology in the wound assay. According to ISO 10993-5, neither BIO-C nor AHP-B was cytotoxic. A viability rate lower than 70 % or more than 20 % of cells showing morphological alterations would

indicate cytotoxicity, as observed in the MTA-F group.²⁸

The growth of hDPC's was not significantly affected by NEOMTA-P or BIO-C in the wound assay. However, the hDPCs exposed to AHP-B exhibited a higher percentage of uncovered areas, supporting the MTT assay findings. In contrast, Saos-2 in the AHP-B group showed the highest coverage at 24h, suggesting cell differentiation: an initial phase of cell proliferation followed by a halt in proliferation and the synthesis of extracellular matrix.¹⁶ Saos-2 treated with BIO-C and NEOMTA-P showed a slowdown in proliferation towards the wound area at 24 and 48 h, suggesting that osteoblastic cells may begin differentiation earlier when exposed to BIO-C and NEOMTA-P. It is crucial to note that BIO-C and NEOMTA-P released high amounts of calcium ions early (1 and 3 h), while AHP-B released calcium ions from 24 to 72 h. Calcium silicate interacts with environmental fluids, releasing calcium ions (Ca^{2+}) into the medium. The amount of calcium released might be higher due to a more significant proportion of calcium silicate or the specific additives used in the formulations.²⁴ Calcium accelerates tissue healing by promoting restorative dentinogenesis, recruiting and activating hard tissue-producing cells.²⁹ The increased calcium signaling from ion

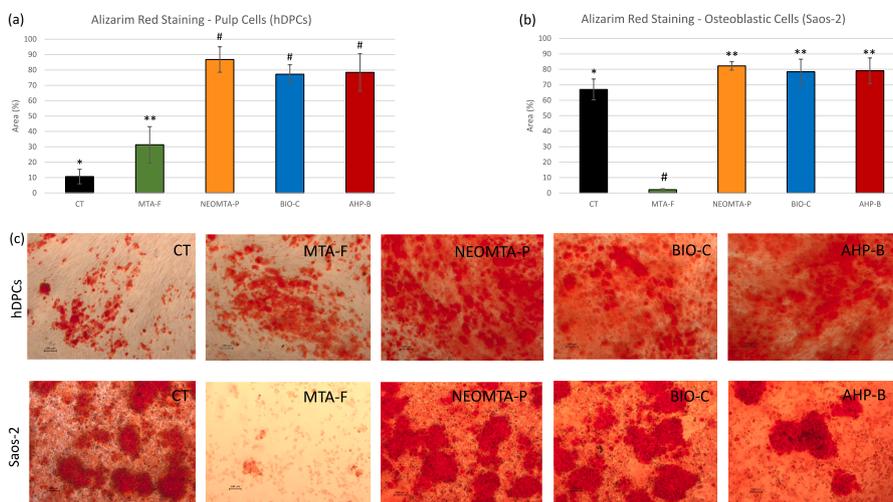


Fig. 3. Mineralization in cultures of hDPCs and Saos-2 as a late marker of osteoblastic differentiation. **Statistics:** Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc tests. Different symbols indicate statistically significant group differences (mean \pm SD, $p < 0.05$).

release into the media may explain the observed halt in the proliferation of osteoblastic cells in favor of differentiation at the first hours of sealer incubation.

Moreover, the DMSO from AHP-B could trigger the release of Ca^{+2} from intracellular stores,²⁰ interfering with the mitochondrial dehydrogenase activity (MTT) and Wound results. Lithium, another component of AHP-B, can activate canonical Wingless (Wnt)/beta (b)-catenin, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt), and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) transduction pathways, promoting osteoblastic activities and increasing osteoblasts proliferation.¹⁸ Lithium, DMSO, and Ca^{+2} properties may explain the osteoblastic cells' response to AHP-B in this study. However, a study showed that the lithium effect is concentration-dependent on human periodontal ligament cells (hPDLs).³⁰ Ideal concentrations of lithium-calcium-silicate activated the gene expression of mineralization markers in hPDLs. However, high concentrations slowed down proliferation and significantly impacted the ALP activity.³⁰ Possibly, the proportion of lithium-calcium-silicate that leached from AHP-B affected the hDPCs similarly, slowing down proliferation.

In osteoblastic cells exposed to AHP-B, the ALP was higher than NEOMTA-P and BIO-C, while the ALP activity in hDPCs was significantly higher in the NEOMTA-P group. ALP activity is a very early marker of osteoblastic differentiation, and the sealers' Ca^{+2} release after 72h, the DMSO, and lithium of AHP-B may also explain such results. Human osteoblasts cultured in osteogenic media supplemented with increasing concentrations of DMSO had enhanced ALP and mineralization.³¹ During mineralization, the building Ca^{+2} gradient first activates ALP, but very high Ca^{+2} concentrations gradually inactivate the enzyme, as Ca^{+2} competes with zinc for ALP M1 and M2 catalytic domains.³² A study that evaluated the crystal structure and biological responses of dental pulp stem cells (hDPSCs) to bone grafts doped with lithium showed that lithium ions favored the entrance of the β -tricalcium phosphate at the calcium sites and calcium vacancy sites.¹² However, lithium concentrations higher than 10 % induced crystal instability, burst the release of lithium ions and showed no improvement in the ALP or mineralization potential of hDPSCs.¹² The increase in alkaline phosphatase (ALP) enzyme expression in cells exposed to calcium silicate-based cement while concurrently maintaining cellular proliferation suggests the potential capability of these materials to promote osteogenic differentiation.²⁷ Prolonged treatment with lithium chloride (LiCl) in the culture of mice dental pulp cells inhibited differentiation.³¹ The LiCl inhibition on hDPCs osteogenesis was not mediated through the Wnt/ β -catenin pathway, suggesting that reparative dentinogenesis may involve

multiple pathways.³² Such results may explain the behavior of hDPCs exposed to AHP-B in our study. In summary, the novel calcium silicate-based bioceramic sealer, AHP-B, did not stimulate the hDPCs during early differentiation as the NEOMTA-P and BIO-C sealers did, although it stimulated the osteoblastic cells.

Based on scientific literature, this *in vitro* study tries to simulate the clinical environment. However, one limitation of this study is that certain variables may, *in vivo*, alter the performance of the evaluated sealers, and it does not fully reflect the complexity of *in vivo* conditions. The absence of systemic factors and the short duration of cell exposure limit the extrapolation of the results to long-term clinical scenarios. Moreover, one may consider the diversity of cells that will respond to the endodontic sealers *in vivo*, osteoblasts and remaining dental pulp cells, periodontal ligament cells, osteoclasts, and macrophages, among others. Indeed, there are some uncertainties regarding the behavior of bio-ceramic materials *in vivo*, particularly in the long term. Ultimately, *in vitro* and *in vivo* research are complementary and essential for advancing scientific knowledge and developing new therapeutic approaches.

5. Conclusion

In this study, AHP-B, NEOMTA-P, and BIO-C stimulated osteogenesis in hDPCs and Saos-2 with notable differences. Considering the cell proliferation and the ALP activity, AHP-B showed an improved early stimulation of osteoblastic cells, while hDPCs were more responsive to NEOMTA-P. All the sealers, except MTA-F, leached high amounts of Ca^{+2} to the media over varying time points. Calcium triggers crucial pathways for osteoblast differentiation. This property is relevant when choosing an endodontic sealer for root canal obturation. For instance, in cases of pulp vitality, like irreversible pulpitis, aiming the fast reeling of the adjacent tissue in the apical region and the remaining pulp tissue in the inaccessible root canal system, an endodontic sealer that releases high amounts of calcium at the first hours and promotes mineralization might be preferable. Conversely, materials that later and continuously leach Ca^{+2} could be more suitable in scenarios involving bone defects and apical lesions, permitting the control of adjacent tissue inflammation and longer stimulating mineralization. This hypothesis deserves further evaluation in a clinical trial.

Funding and support

This work was supported by the University of Brasilia (PROAP/DGP),

Brazil.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement

The authors acknowledge the University of Brasília Microscopy Laboratory for their cooperation with the micrograph images.

References

- Zhou H, Shen Y, Zheng W, Li L, Haapasalo M. A comprehensive review of endodontic sealers: properties, components, and clinical applications. *J Endod.* 2021;47(7):1085–1097.
- Nair PNR, Love RM. Biocompatibility and tissue regeneration in endodontic sealers. *J Endod.* 2021;47(6):832–845.
- 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(4):225–228.
- Alves Silva EC, Tanomaru-Filho M, da Silva GF, Delfino MM, Cerri PS, Guerreiro-Tanomaru JM. Biocompatibility and bioactive potential of new calcium silicate-based endodontic sealers: Bio-C sealer and sealer plus BC. *J Endod.* 2020;46(10):1470–1477.
- Koch K. Bioceramic technology a game changer in endodontic obturation. *Art of Dentistry.* 2011;9:164–173.
- Koch KA, Brave DG. Bioceramics, Part II: the clinician's viewpoint. *Dent Today.* 2012;31:118–122.
- Donnermeyer D, Schemkämper P, Bürklein S, Schäfer E. Short and long-term solubility, alkalinizing effect, and thermal persistence of premixed calcium silicate-based sealers: AH plus bioceramic sealer vs. Total fill BC sealer. *Materials.* 2022;15(20):7320, 19.
- Yang C, Madhu V, Thomas C, et al. Inhibition of differentiation and function of osteoclasts by dimethyl sulfoxide (DMSO). *Cell Tissue Res.* 2015;362(3):577–585, 30.
- Hajji H, Le Gallet S, Saviot L, Ben Salem E, Millot N. Mechano-synthesis of carbonate and lithium co-substituted hydroxyfluorapatite. *Mater Res Bull.* 2022;150, 111750.
- Matsumoto N, Yoshida K, Hashimoto K, Toda Y. Thermal stability of β -tricalcium phosphate doped with monovalent metal ions. *Mater Res Bull.* 2009;44(9):1889–1894.
- Yoo KH, Kim Y, Kim YI, Bae MK, Yoon SY. Lithium doped biphasic calcium phosphate: structural analysis and osteo/odontogenic potential in vitro. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;8(10), 993126.
- Queiroz MB, Torres FFE, Rodrigues EM, et al. Physicochemical, biological, and antibacterial evaluation of tricalcium silicate-based reparative cements with different radiopacifiers. *Dent Mater.* 2021;37(2):311–320.
- Sanz JL, López-García S, Rodríguez-Lozano FJ, et al. Cytocompatibility and bioactive potential of AH Plus Bioceramic Sealer: an in vitro study. *Int Endod J.* 2022;55(10):1066–1080, 11.
- Patil R, Kale AD, Mane DR, Patil D. Isolation, culture and characterization of primary cell lines of human buccal mucosal fibroblasts: a combination of explant enzymatic technique. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2020;24:68–75.
- 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(1), 18.
- Gomes-Cornélio AL, Rodrigues EM, Salles LP, et al. Bioactivity of MTA plus, Biodentine and an experimental calcium silicate-based cement on human osteoblast-like cells. *Int Endod J.* 2015;50:39–47.
- Aminoshariae A, Kulild JC. The impact of sealer extrusion on endodontic outcome: a systematic review with meta-analysis. *Aust Endod J.* 2020;46:123–129.
- Wong SK, Chin KY, Ima-Nirwana S. The skeletal-protecting action and mechanisms of action for mood-stabilizing drug lithium chloride: Current evidence and future potential research areas. *Front Pharmacol.* 2020;7(11):430.
- Hoang C, Nguyen AK, Nguyen TQ, et al. Application of dimethyl sulfoxide as a therapeutic agent and drug vehicle for eye diseases. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2021;37(8):441–451.
- Koutroulis A, Kuehne SA, Cooper PR, Camilleri J. The role of calcium ion release on biocompatibility and antimicrobial properties of hydraulic cements. *Sci Rep.* 2019;9(1), 19019, 13.
- Morley P, Whitfield JF. The differentiation inducer, dimethyl sulfoxide, transiently increases the intracellular calcium ion concentration in various cell types. *J Cell Physiol.* 1993;156(2):219–225.
- 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(22), 13914, 11.
- Siboni F, Taddei P, Prati C, Gandolfi MG. Properties of NeoMTA plus and MTA plus cements for endodontics. *Int Endod J.* 2017;14(50):e83–e94.
- Sanz JL, López-García S, Lozano A, et al. Microstructural composition, ion release, and bioactive potential of new premixed calcium silicate-based endodontic sealers indicated for warm vertical compaction technique. *Clin Oral Investig.* 2021;25(3):1451–1462.
- Silva EM, Alcalde MP, Vivan RR, Pomini M, Tanomaru-Filho M, Duarte MAH. Evaluation of in vitro experimental model for analysis of bioceramic sealers. *Braz Oral Res.* 2022;10(36):e100.
- Amoroso-Silva PA, Guimarães BM, Marciano MA, et al. Microscopic analysis of the quality of obturation and physical properties of MTA Fillapex. *Microsc Res Tech.* 2014;77(12):1031–1036.
- Sismanoglu S, Ercal P. Effects of calcium silicate-based cements on odonto/osteogenic differentiation potential in mesenchymal stem cells. *Aust Endod J.* 2023 Apr;49(1):66–74.
- 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(7):871–879.
- Khoswanto C, Dewi IK. MTA as modulator of periapical tissue healing in rat molar: a histological study. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2024;14(2):201–204.
- Zhang Q, Chen L, Chen B, Chen C, et al. Lithium-calcium-silicate bioceramics stimulating cementogenic/osteogenic differentiation of periodontal ligament cells and periodontal regeneration. *Appl Mater Today.* 2019;16:375–387.
- Stephens AS, Stephens SR, Hobbs C, et al. Myocyte enhancer factor 2c, an osteoblast transcription factor identified by dimethyl sulfoxide (DMSO)-enhanced mineralization. *J Biol Chem.* 2011;286(34):30071–30086, 26.
- Hoylaerts MF, Van Kerckhoven S, Kiffer-Moreira T, Sheen C, Narisawa S, Millán JL. Functional significance of calcium binding to tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *PLoS One.* 2015;10(3), e0119874, 16.



OPEN

Calcium silicate-based cements cause environmental stiffness and show diverse potential to induce osteogenesis in human osteoblastic cells

Marcos Coelho Santiago ¹, Ana Livia Gomes-Cornélio ², Laudimar Alves de Oliveira ³, Mario Tanomaru-Filho ⁴ & Loise Pedrosa Salles ⁵✉

Calcium silicate-based cements differ markedly in their radiopacifiers and the presence of calcium sulfate, aluminates, carbonates and other components that can affect their biological properties. This study aimed to compare the biological properties of six calcium silicate cements in human osteoblastic cell culture (Saos-2 cells): Bio-C Repair (Bio-C), PBS HP (PBS-HP), Biodentine (Biodentine), MTA Repair HP (MTA-HP), NeoMTA Plus (NeoMTA-P), and ProRoot MTA (ProRoot). After exposure to these materials, the cells were analyzed by MTT, wound healing, cell migration, and alkaline phosphatase activity (ALP) assays, real-time PCR (qPCR) analysis of the osteogenesis markers (osteocalcin or bone gamma-carboxyglutamate protein, *BGLAP*; alkaline phosphatase, *ALPL*; bone sialoprotein or secreted phosphoprotein 1, *BNSP*), and alizarin red staining (ARS). Curiously, the migration rates were low 24–48 h after exposure to the materials, despite the cells showing ideal rates of viability. The advanced and intermediate cell differentiation markers *BGLAP* and *BNSP* were overexpressed in the Bio-C, MTA-HP, and ProRoot groups. Only the Biodentine group showed *ALPL* overexpression, a marker of initial differentiation. However, the enzymatic activity was high in all groups except Biodentine. The mineralization area was significantly large in the NeoMTA-P, ProRoot, PBS-HP, MTA-HP, and Bio-C groups. The results showed that cellular environmental stiffness, which impairs cell mobility and diverse patterns of osteogenesis marker expression, is a consequence of cement exposure. Environmental stiffness indicates chemical and physical stimuli in the microenvironment; for instance, the release of cement compounds contributes to calcium phosphate matrix formation with diverse stiffnesses, which could be essential or detrimental for the migration and differentiation of osteoblastic cells. Cells exposed to Bio-C, PBS-HP, ProRoot, NeoMTA-P, and MTA-HP seemed to enter the advanced or intermediate differentiation phases early, which is indicative of the diverse potential of cements to induce osteogenesis. Cements that quickly stimulate osteoblast differentiation may be ideal for reparative and regenerative purposes since they promptly lead to dentin or bone deposition.

Repairing root perforations, root resorptions, and open apices represents a challenge for endodontists, mainly because these conditions demand the formation of mineralized tissue¹. This challenge has led to the evolution of calcium silicate-based cements with increased biocompatibility and bioactivity¹. In this context, mineral

¹Post-Graduation Program in Dentistry, Faculty of Health Sciences, University of Brasilia (UnB), Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF 70910-900, Brazil. ²Department of Dentistry, Hospital das Forças Armadas (HFA), Cruzeiro Novo, Brasília, DF 70658-900, Brazil. ³Department of Dentistry, Faculty of Health Sciences, University of Brasilia (UnB), Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF 70910-900, Brazil. ⁴Department of Restorative Dentistry, Araraquara Dental School, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Araraquara, Araraquara, SP 14801-903, Brazil. ⁵Department of Dentistry, Faculty of Health Sciences, University of Brasilia (UnB), Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF 70910-900, Brazil. ✉email: loise@unb.br

trioxide aggregate (MTA) represents a milestone in the use of calcium silicate cements for reparative endodontic treatment¹.

MTA can be considered the precursor of new calcium silicate-based cements². The first MTA formulation was composed of calcium silicates, bismuth oxide, calcium carbonate, calcium sulfate, and calcium aluminate¹. MTA (Angelus) replaced radiopacified bismuth oxide (Bi_2O_3) with calcium tungstate (CaWO_4)². The results presented in clinical trials led to MTA becoming the material of choice for retrograde fillings and the treatment of root perforations³. However, MTA still presents disadvantages, such as handling difficulties, dental structure discoloration, a fast initial setting time (approximately 30 min), and a long final setting time (up to 10 h), which has prompted the development of new calcium silicate cements^{4,5}. These new compositions aim to increase the biocompatibility as well as the flow and release of calcium ions^{1,5}. In particular, the release of Ca^{2+} enhances the formation of calcium hydroxide through the chemical reactions of tricalcium and dicalcium silicates during material setting⁴.

Biodentine was one of the first cements indicated as a bioactive substitute for MTA during reparative and regenerative therapy⁶. In general, the new calcium silicate-based cement components are calcium oxides, calcium carbonates, calcium hydroxide, or calcium phosphates, which are added to calcium silicates and radiopacifying agents^{7,8}. Biodentine, for example, is composed of tricalcium and dicalcium silicate, with zirconium oxide as the radiopacifying agent⁶. Recently, Rathinam et al.⁹ evaluated the viability and matrix mineralization potential of human dental pulp stem cells (hDPSCs) exposed to Biodentine and ProRoot MTA. This study demonstrated that calcium silicate-based cements alter extracellular and intracellular Ca^{2+} dynamics and trigger hDPC differential gene expression, differentiation, and mineralization potential. ProRoot MTA exposure caused downregulation of bone morphogenetic 2 (*BMP2*) gene expression in hDPSCs and, in contrast, Biodentine stimulated its overexpression⁹. It was also found that the release of Ca^{2+} from Biodentine was higher than that from ProRoot MTA⁹. The specific calcium dynamics of these biomaterials determines their differentiation and mineralization outcomes. Increases in Ca^{2+} dynamics enhances mineralization. Interestingly, the authors confirmed that the frequency, duration, and amplitude of Ca^{2+} transients are essential for increasing the efficiency and specificity of gene expression in dental pulp cells⁹. Another study revealed that a water-based tricalcium silicate cement had greater Ca^{2+} ion release, which is associated with a strong antimicrobial effect but not cytotoxicity in mouse 3T3 cells (a model to study the calcium-mediated actin reset due to physiological changes) or human dental pulp cells¹⁰. In contrast, studies have indicated cytotoxicity for Biodentine, mainly before it is completely set (fresh leachates) and also according to the concentration^{10,11}. Another limitation of Biodentine is the need for specific preparation equipment^{11–13}. A ready-to-use calcium silicate-based cement, Bio-C Repair, recently became available for reparative or regenerative endodontic treatments.

The manufacturer claims that the material presents the biological properties of MTA-based cements with easier handling. The composition of Bio-C Repair cement evolved from its precursor MTA Repair HP. Both of these cements are calcium silicate-based; however, MTA Repair HP has calcium tungstate as the radiopacifying agent¹⁴, while in Bio-C Repair, the radiopacifier is substituted by zirconium oxide. A study evaluating the physical–chemical properties of MTA HP Repair with ProRoot MTA and NeoMTA Plus showed promising results with respect to the setting time, hydration, and Ca^{2+} ion release¹⁴. Interestingly, NeoMTA Plus is another silicate-based cement, in which its main difference is the use of tantalum oxide (Ta_2O_5) as the radiopacifying agent. From 2010 to 2012, there was great interest in new MTA formulations, especially changing the radiopacifying agent to something other than bismuth oxide. The possible interference of these composition changes on the biological properties of the cement must be investigated¹⁴. PBS HP, composed of dicalcium silicate, mineral oxides, and pozzolan, is a recently proposed cement. PBS HP showed promising results as a graft material in dental implants by maintaining the socket architecture¹⁵. Histological images showed newly formed fibroblasts, osteoid cells, mineralized bone tissue, and connective tissue encasing PBS HP. Additional information on the properties of PBS HP is still very scarce. The manufacturers indicate the use of Bio C Repair and PBS HP for reparative and regenerative treatments. However, the scientific literature lacks comparative studies evaluating the biological properties of Bio-C Repair and PBS HP with other calcium silicate-based materials. In addition, the literature shows that dental pulp and bone cells respond in diverse ways to different calcium silicate-based cements.

Therefore, this study aimed to evaluate the biocompatibility and osteogenesis-inducing potential of Bio-C Repair (Bio-C), PBS HP (PBS-HP), Biodentine (Biodentine), MTA Repair HP (MTA-HP), NeoMTA Plus (NeoMTA-P) and ProRoot MTA (ProRoot) in cultures of human osteoblastic cells (Saos-2). Saos-2 cells are considered to be a suitable model to study osteoblast differentiation^{11,16,17}. Our general null hypothesis was that there was no difference between the cell responses after exposure to these different materials.

Results

Cell viability. After 24 h, Saos-2 cells exposed to Bio-C, PBS-HP, ProRoot, and Biodentine showed viability rates statistically similar to that of the control group (CT; 100.65%, 95.3%, 98.5%, 101.78%, and 100.23%, respectively). The cells exposed to NeoMTA-P (75.10%) and MTA-HP (90.36%) showed significantly lower viability rates than CT (Fig. 1). All groups had higher viability rates than ZOE (25.97%).

Cell migration. Saos-2 cells exposed to Bio-C and NeoMTA-P showed similar percentages of wound areas, with open spaces at 0, 24, and 48 h (Fig. 2a). The migration rates (Fig. 2b) of the cells exposed to Bio-C and NeoMTA-P were low until 48 h ($< 3 \mu\text{m}/\text{h}$) and only increased after 72 h ($> 20 \mu\text{m}/\text{h}$). The PBS-HP and Biodentine groups showed higher migration rates than the other groups at 24 h but a significantly smaller migration rate than the control group (CT). The migration rates of Bio-C, MTA-HP, and NeoMTA-P exceeded that of the CT only at 72 h. The PBS-HP, Biodentine, and ProRoot groups ($> 10 \mu\text{m}/\text{h}$) exceeded the CT migration rate only at 96 h. The association between the migration rate and exposure time was significant according to the two-way

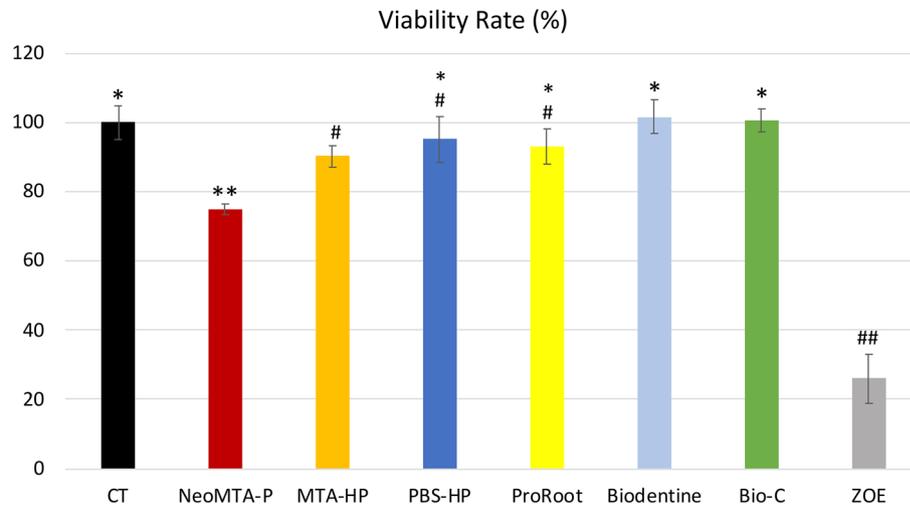


Figure 1. Cell viability rates. CT, positive control group (unexposed cells). NeoMTA-P, MTA-HP, PBS-HP, ProRoot, Biodentine, Bio-C, and ZOE (negative control) were the groups of cells exposed to the respective types of cement. The viability rates of the cells exposed to PBS-HP, ProRoot, Biodentine, and Bio-C were similar to those of the control group. However, NeoMTA-P and MTA-HP exposure led to a significantly lower viability rate than CT. Data are presented as mean \pm SD; one-way ANOVA, followed by multiple comparisons post-hoc test with Bonferroni's test. Symbols on the chart indicate homogeneous groups by Bonferroni's posttest. * $p < 0.005$, all groups versus CT; ** $p < 0.001$, comparisons among cement groups; # $p < 0.005$, comparisons among cement groups; ## $p < 0.001$, ZOE versus all groups.

ANOVA ($p < 0.05$), which indicates that the relationship between the type of cement and the migration rate was dependent on the exposure time (Fig. 2b). From the microscopy observations (Fig. 2c), the control group (CT) was the only group with complete closure of the wound area at 96 h. Interestingly, the cells adjacent to the wound in the calcium silicate cement groups were overconfluent with typical morphologies.

Gene expression. After 96 h of exposure, the fold change in the expression of osteocalcin (*BGLAP*) was significantly high in the ProRoot (2.15 ± 0.30 ; mean and stdv), Bio-C (4.88 ± 1.60), and MTA-HP (4.89 ± 0.92) groups. The bone sialoprotein (*BNSP*) gene was significantly overexpressed in the Bio-C (1.45 ± 0.32), NeoMTA-P (1.48 ± 0.27), and ProRoot groups (2.92 ± 0.32) compared to the control group. Only the Biodentine group showed higher expression of the alkaline phosphatase gene (*ALPL*) than the CT group. The PBS-HP, Bio-C, NeoMTA-P, and ProRoot groups showed statistically similar inhibition of *ALPL* expression. All of these genes were inhibited in cells exposed to the negative control ZOE (Fig. 3).

Alkaline phosphatase activity. Saos-2 cells exposed to the Bio-C (1078.6 thymolphthalein/min/L/OD \pm 109.6), PBS-HP (1128.5 thymolphthalein/min/L/OD \pm 69.1), NeoMTA-P (1301 thymolphthalein/min/L/OD \pm 67), ProRoot (1159 thymolphthalein/min/L/OD \pm 64.5) and MTA-HP (1205 thymolphthalein/min/L/OD \pm 63.2) cements showed significant increases in ALP activity compared to the CT group. The ALP activity of Biodentine (1003 thymolphthalein/min/L/OD \pm 57.8) was similar to that of the CT group (1000.7 thymolphthalein/min/L/OD \pm 49.8) (Fig. 4).

Mineralization assay. The mineralization potential of the cells exposed to the six different reparative cements was verified using an alizarin red staining (ARS) assay and the results were compared to those of the control group (CT) and ZOE group (zinc-eugenol cement, a negative comparator). After 15 days in osteogenic media under cell culture conditions, the mineralization in all of the cement groups were significantly different from that in the CT ($p < 0.05$), except Biodentine (Fig. 5a,b). Mineralization staining (ARS) was impressive in the NeoMTA-P, MTA-HP, PBS-HP, ProRoot, and Bio-C groups (Fig. 5a). The NeoMTA-P images showed an upper layer rich in mineralization nodules (Fig. 5a). However, there was no significant difference in the percentage of mineralized areas between the NeoMTA-P, MTA-HP, PBS-HP, ProRoot, and Bio-C groups (Fig. 5b). The PBS-HP ARS percentage was significantly lower than that in the NeoMTA-P and MTA-HP groups ($p < 0.05$), but the cells continued to have high mineralization potential (ARS of approximately 80%) compared to the CT. The cells exposed to ZOE showed altered morphological characteristics and almost no staining (Fig. 5a). The ARS area in the ZOE group was significantly lower than that in the other groups (Fig. 5b).

Discussion

The present study is the first to compare the biological properties of Bio-C, PBS-HP, MTA-HP, Biodentine, ProRoot, and NeoMTA-P in a culture of human osteoblastic cells. The calcium silicate cements showed different biological effects in Saos-2 cells, refuting our null hypothesis. In particular, Bio-C, PBS-HP, MTA-HP, and NeoMTA-P showed significantly low migration rates in the first 48 h of osteoblastic cell exposure. Bio-C

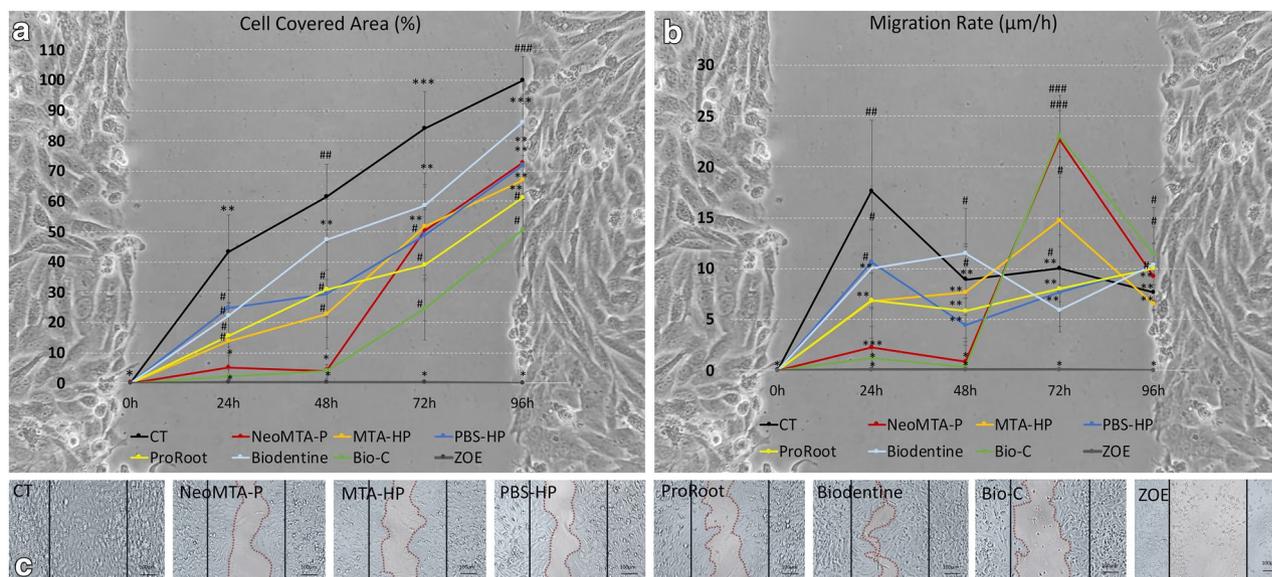


Figure 2. (a–c) Wound area covered by cells, cell migration rates, and representative images of the cells after 96 h of exposure. The surface areas of the wound covered by the osteoblastic cells exposed to the reparative cements were significantly smaller than the control group of unexposed cells (CT) at all times evaluated (a). Impairment of cell migration could be observed at 24 h in the calcium silicate-based cement groups, suggestive of environmental stiffness (b). Osteoblastic cells exposed to NeoMTA-P and Bio-C for 24 and 48 h showed a significantly lower migration rate than the other groups, especially when compared to CT. From 48, 72, to 96 h, the migration rates of the osteoblastic cells exposed to MTA-HP, PBS-HP, ProRoot, and Biodentine were similar to that of CT. The cells exposed to NeoMTA-P and Bio-C showed a significant increase in migration rates only after 72 h of exposure (b). At 96 h, the unexposed cells (CT) showed complete closure of the wound area. However, the cells exposed to NeoMTA-Plus, MTA-HP, PBS-HP, ProRoot, Biodentine, and Bio-C did not migrate enough to close the wound gap (c). Interestingly, the cell morphologies were typical without evident signs of cytotoxicity except for the comparator group (ZOE), which showed dead cells and a completely open area (c). Micrographs at $\times 20$, 100 μm bars (c). The backgrounds in (a,b) are representative images of the wound healing at the initial time (T₀). Data are presented as mean \pm SD of area covered by cells (a) and migration rates (b) at each exposure time; two-way ANOVA followed by multiple comparisons post-hoc test with Bonferroni's posttest. Symbols on the charts indicate homogeneous groups by Bonferroni's posttest. (a) * $p < 0.001$, all groups within the different times of exposure versus CT (0 h); $^{\#}p < 0.02$, cement groups versus each other within the different times of exposure; ** $p < 0.05$, all groups within the different times of exposure versus CT (24 h); $^{\#\#}p < 0.03$, all groups within the different times of exposure versus CT (48 h); *** $p < 0.02$, all groups within the different times of exposure versus CT (72 h); and $^{\#\#\#}p < 0.005$, all groups within the different times of exposure versus CT (96 h). (b) * $p < 0.001$, all groups within the different times of exposure versus CT (0 h); $^{\#}p < 0.05$, all groups versus each other within the different times of exposure; ** $p < 0.03$, all groups versus each other within the different times of exposure; $^{\#\#}p < 0.02$, all groups within the different times of exposure versus CT (24 h); *** $p < 0.02$, NeoMTA-P (24 h) versus all groups within the different times of exposure; and $^{\#\#\#}p < 0.001$, NeoMTA-P and Bio-C (72 h) versus all groups within the different times of exposure.

treatment surpassed standard MTA-based cements with respect to osteocalcin gene expression. The cell migration and gene expression patterns indicated a shift toward osteogenesis after osteoblastic cell exposure to this endodontic repair material.

Biocompatibility and bioactivity are relevant properties that can lead the material to be the first choice for reparative and regenerative endodontic treatments. Saos-2 cells exposed to Bio-C and PBS-HP showed high viability rates, revealing the biocompatibility of these cements to human bone cells. Most likely, this biocompatibility is a consequence of the material's ability to maintain a basic pH in the surrounding environment and calcium ion (Ca^{2+}) release¹⁸. The Ca^{2+} concentration in the cytoplasm is essential to mitochondrial activity, as evaluated by an MTT assay¹⁹. According to our results, ProRoot, MTA-HP, Neo MTA-P, and Biodentine can also be considered biocompatible with osteoblastic cells. However, a different study reported cytotoxicity to human apical papilla cells after exposure to ProRoot and Biodentine in a dose- and time-dependent manner²⁰. ProRoot and Biodentine showed similar cytotoxicity in MG63 osteoblastic cells and human dental pulp cells^{21,22}. The divergence of responses between these diverse cell lines highlights the relevance of cell culture studies. Studies in cell culture systems can predict the possibility of adverse effects, depending on the type of tissue exposed to the material. The setting time, direct tissue contacts, specificities of each cell line, optimal stiffness for cell migration, and elutes containing toxic elements from the cement composition can all influence the biocompatibility and bioactivity²³. A study evaluating Biodentine, Bio-C Pulpo, TotalFill BC RRM (Root Repair Material), TheraCal LC, and ACTIVA BioACTIVE showed that the water-based cements had greater calcium ion release, which was associated with a more substantial antimicrobial effect but not enhanced biological activity¹⁰. The additives

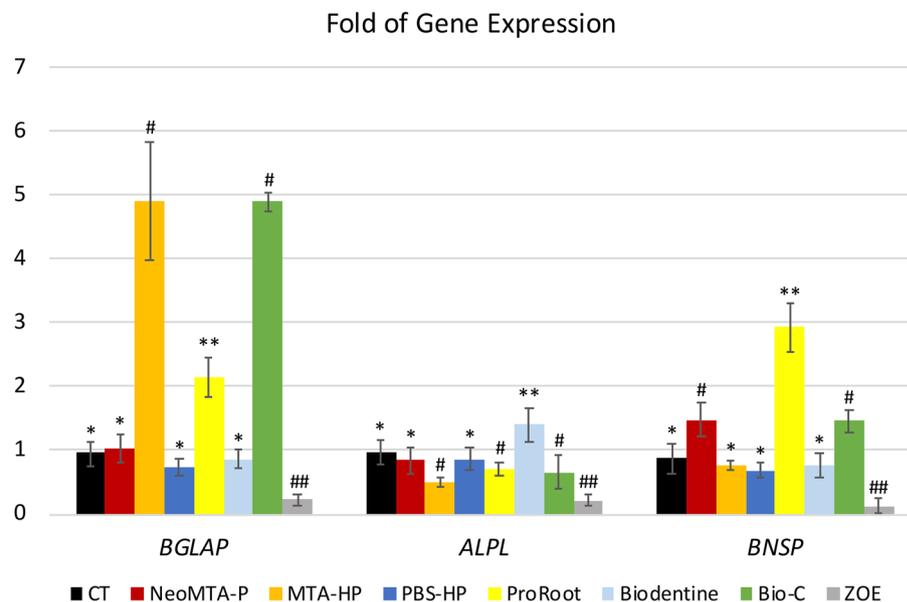


Figure 3. Fold change in expression of the genes *BGLAP*, *ALPL*, and *BSP*. The fold change in the expression of osteocalcin (*BGLAP*) was significantly high in the ProRoot, Bio-C, and MTA-HP groups after 96 h of cell exposure. The bone sialoprotein (*BSP*) gene was significantly overexpressed in the Bio-C, NeoMTA-P, and ProRoot groups. Only the Biodentine group showed a significantly high expression of alkaline phosphatase (*ALPL*). All genes were inhibited in the ZOE group. Data are presented as mean \pm SD; one-way ANOVA, followed by multiple comparisons post-hoc test with Bonferroni's test. Symbols on the chart indicate homogeneous groups by Bonferroni's posttest. * $p < 0.005$, all groups versus CT; ** $p < 0.001$, comparisons among cement groups; # $p < 0.002$, comparisons among cement groups; ## $p < 0.003$, ZOE versus all groups.

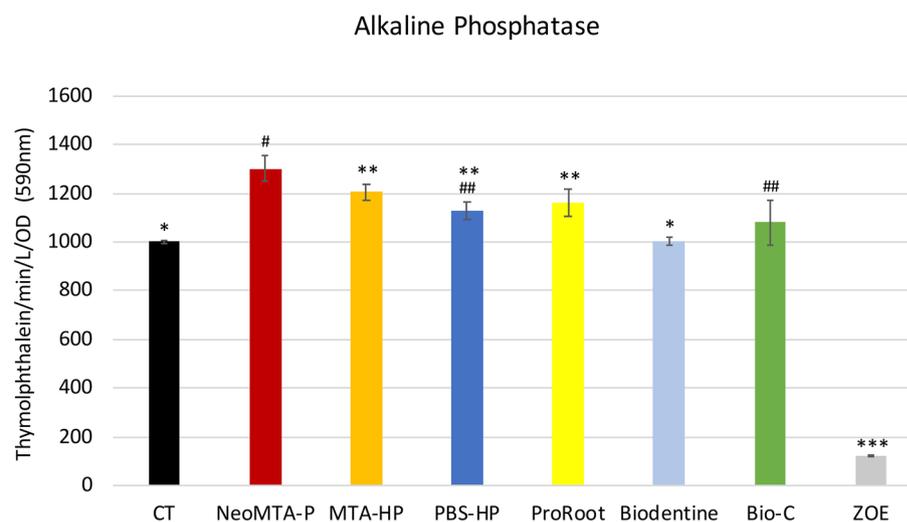
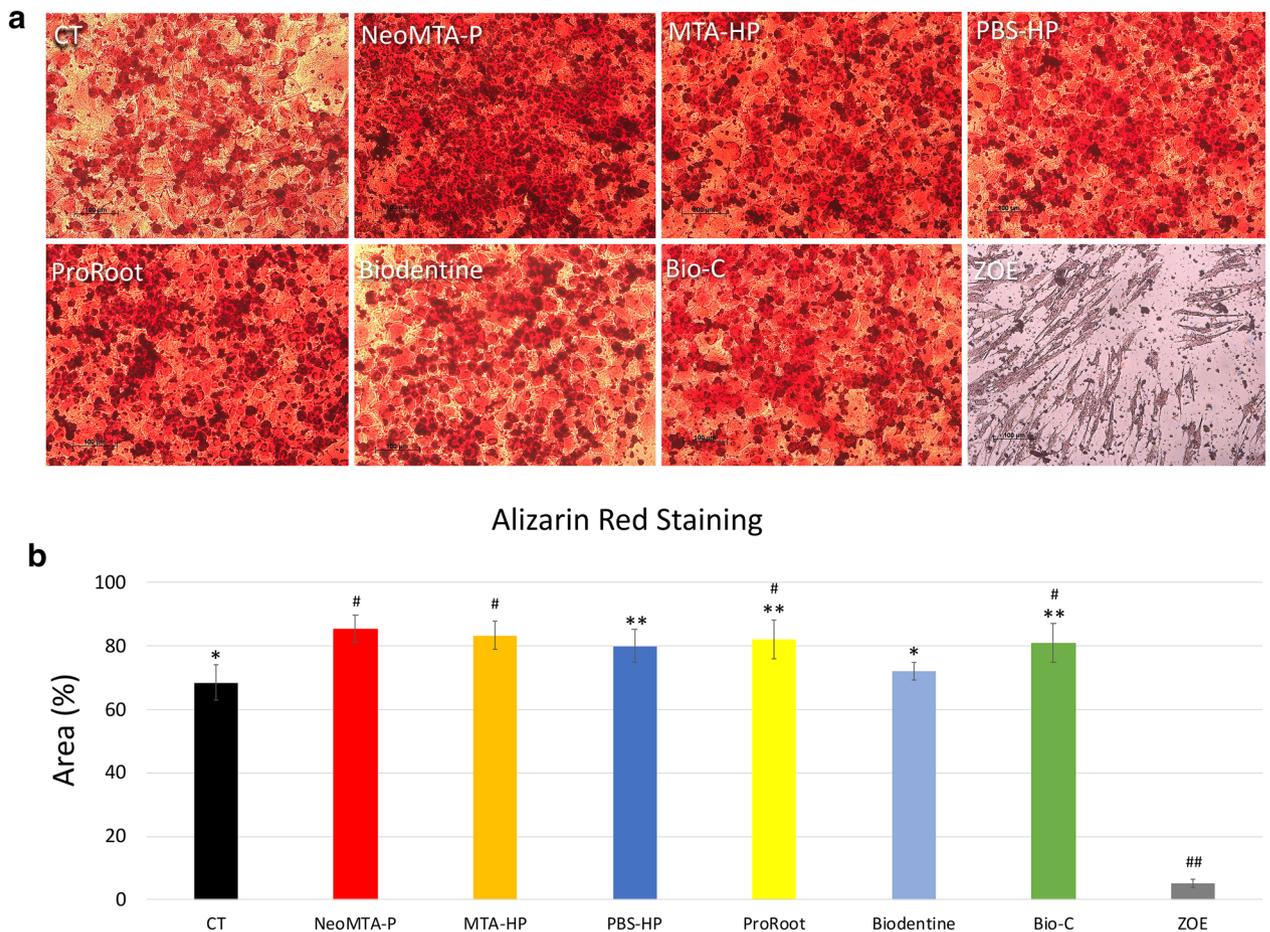


Figure 4. Alkaline phosphatase activity (ALP). The osteoblastic cells showed significantly high ALP activity after exposure to the reparative cements NeoMTA-P, MTA-HP, PBS-HP, ProRoot, and Bio-C compared to the control group (CT). Only Biodentine was statistically similar to the CT. Data are presented as mean \pm SD; one-way ANOVA, followed by multiple comparisons post-hoc test with Bonferroni's test. Symbols on the chart indicate homogeneous groups by Bonferroni's posttest. * $p < 0.01$, all groups versus CT; # $p < 0.001$, NeoMTA-P versus all groups; ** $p < 0.02$, MTA-HP versus all groups; ## $p < 0.02$, PBS-HP versus all groups; and *** $p < 0.001$, ZOE versus all groups.

altered the hydration and leaching profile of the prototype cement. Microsilica inclusions resulted in decreased long-term calcium hydroxide formation associated with neutralized cytotoxicity and antibacterial activity¹⁰. For instance, ProRoot uses bismuth oxide as a radiopacifying agent, a compound that has been reported to present some level of cytotoxicity²⁴. Biodentine contains brown iron oxide and CaCl_2 to shorten the setting time²¹, which could also be responsible for some cytotoxic effects. The authors that observed a low viability rate for cells



Figures 5. (a,b) Mineralization assay to detect calcium nodules and alizarin red staining (ARS). After 15 days of exposure, the representative images show the mineralized nodules in the NeoMTA-P, MTA-HP, PBS-HP, ProRoot, Biodentine, and Bio-C groups throughout the field (a). The ZOE group image shows almost no mineralization or morphological changes, and the cells appear shrunken (a). Statistical analysis showed significantly increased staining for all cement groups compared with the CT, except Biodentine and ZOE (a). Data are presented as mean \pm SD; one-way ANOVA, followed by multiple comparisons post-hoc test with Bonferroni's test. Symbols on the chart indicate homogeneous groups by Bonferroni's posttest. * $p < 0.001$, all groups versus CT; # $p < 0.01$, comparisons among cement groups; ** $p < 0.05$, comparisons among cement groups; and ## $p < 0.001$, ZOE versus all groups.

exposed to Biodentine posed two possible hypotheses: one was the effect of cell differentiation disallowing the cells to enter a proliferative phase, and the other hypothesis was due to cytotoxicity that impairs metabolism²⁰. Their study used Alamar Blue to assess the viability of the cells²⁰ and suggested that it would also be interesting to assess whether the bioactive compounds affected mitochondrial activity, which is precisely the principle of the MTT assay used in our study. Except for the cells in the NeoMTA-P, MTA-HP, and ZOE groups, the osteoblast-like cells showed mitochondrial dehydrogenase activity similar to that of the CT (by MTT assay). Together, the response of the osteoblastic cells to the material exposure by MTT assay, wound healing assay and the pattern of gene expression support the cell differentiation profile hypothesis instead of the cytotoxic effect. Cytotoxicity was observed only for ZOE as a comparator group, whose treatment led to substantial cell death and inhibition of osteogenic marker expression.

The wound healing experiment offered relevant information regarding the viability and migration of cells exposed to calcium silicate cements. The wound gap after 96 h of exposure was still open in all groups of cells exposed to these materials. However, no significant cellular morphological characteristic due to possible cytotoxic effects from NeoMTA-P, MTA-HP, PBS-HP, ProRoot, Biodentine, or Bio-C were observed. The cells seemed to proliferate on top of each other when exposed to the calcium silicate-based cements and formed cohesive clusters instead of migrating toward the wound, as observed in the control group. Curiously, the migration rates were very low during the first 24 and 48 h of exposure to the osteoblastic cells, except for in the Biodentine group at 48 h. Cell migration is recognized to be sensitive to mechanochemical environmental stiffness. Each cell type exhibits an optimum stiffness, at which migration reaches its maximum²⁵. In the Bangasser et al. model, intracellular molecules such as myosin II transmit force to the external environment through actin filament bundles and compliant transmembrane molecular proteins²⁶. This group studied the effects of substrate stress on cell spreading, collective cell durotaxis, and ex vivo cell migration as a function of adhesion molecule expression.

It is possible that compounds released from calcium silicate cements into the environment affect F-actin flow, nonmuscle myosin II (NMII), and adhesion molecule expression in osteoblastic cells, contributing to or impairing their mechanical properties, a hypothesis to be further investigated²⁷. NMII has been demonstrated to play an essential role in cell morphology, migration, and differentiation²⁷. NMII generates forces that alter biochemical signaling by driving changes in interactions between actin-associated proteins that can ultimately regulate gene transcription and cytoskeletal organization and alter actomyosin contractility in stems²⁷. Adhesion and migration rates are mechanical properties of osteoblasts that are important in the cell response to biomaterials and modulation of bone formation²⁶. The mechanical properties, cytoskeletal structure, and motility of cells are known to reflect different cell differentiation stages^{25,26}. Together, the wound healing results indicated that all of the tested calcium silicate-based cements affected the mechanical properties and motility of the osteoblastic cells to different extents.

Tissue stiffness should be considered when choosing a dental material for pulp or bone repair. For example, standard tissue stiffness varies from brain tissue to bone tissue²⁶. In our study, the cell migration rates increased only after 72 h of exposure in both groups, which is indicative of the environmental stiffness of the osteoblastic cells exposed to Bio-C and NeoMTA-P. After 96 h of exposure to the Bio-C, PBS-HP, ProRoot, NeoMTA-P, and Biodentine cements, the cells presented a faster migration rate than the control group. A study with MTA-HP and NeoMTA-P on human pulp cells exposed to elutes showed similarly low migration rates and open wounds after 48 h without cytotoxic characteristics²⁸. The activation of Ca²⁺ signaling pathways may explain osteoblastic cell behavior after exposure to calcium silicate cements. A high concentration of Ca²⁺ released from the cement possibly stimulated cell differentiation to the detriment of proliferation¹⁰. Evaluation of the water-based tricalcium silicate materials BCP, Biodentine, and TotalFill in 3T3 and hDPC cultures indicated that the inclusion of additives in hydraulic cements affected Ca²⁺ release to different extents, which in turn modified the biocompatibility and bioactivity of the leachates¹⁰. A study on an MTA-based cement showed dual modulation in human dental pulp cells through calcium-sensing receptors (CaSRs) triggered by Ca²⁺ and alkaline pH²⁹. Cascade activation of the MTA-CaSR-phospholipase C pathway played an essential role in osteogenic differentiation by regulating the transcription of the osteocalcin (*BGLAP*), osteopontin (*SPP1*), and bone sialoprotein (*BNSP*) genes²⁹.

The patterns of expression of *ALPL* (alkaline phosphatase), *BNSP*, and *BGLAP* divide osteoblastogenesis into 3 phases: the initial phase (*ALPL* overexpression), the intermediate phase (*BNSP* overexpression), and the advanced phase (*BGLAP* overexpression)³⁰. In this study, osteoblastic cells exposed to Bio-C and MTA-HP showed the highest fold change in *BGLAP* expression (MTA-HP ~ Bio-C > ProRoot), which is indicative of the advanced phase of cell differentiation. MTA-based materials have been shown to induce osteoblastogenesis through the activation of *BGLAP* by transcription factor 6 (*Atf6*)²⁹. Osteocalcin is the most abundant noncollagen protein in bone and an important mineralization marker. It is possible that osteocalcin regulates the mineralization rate³⁰. *BNSP*, another marker of osteogenesis, was significantly overexpressed in the ProRoot, Bio-C, and NeoMTA-P groups (ProRoot > Bio-C ~ NeoMTA-P). In contrast, *ALPL* gene expression was inhibited in the Bio-C, MTA-HP, and ProRoot groups. Only the Biodentine group showed *ALPL* overexpression, a marker of initial differentiation³⁰. A study with hDPCs exposed to Biodentine and ProRoot indicated that the high pH and release of calcium ions could influence the differential expression of the osteogenesis markers *BGLAP* and *BMP-2*⁹. The alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells exposed to the repair cement significantly increased after 5 days compared to the control group. Except for the Biodentine group, which showed no difference in ALP activity, the alkaline phosphatase results followed *ALPL* expression inhibition as negative feedback for Biodentine. Another study supported this hypothesis with Saos-2 cells exposed to MTA Plus¹¹. PBS-HP was the cement that showed the highest migration rate in the first 24 h of cell exposure and the lowest fold change in gene expression. However, ALP activity was high in this cement group after 5 days of exposure. PBS-HP has a short setting time due to the pozzolan in its composition¹⁵, which probably leads to the bioavailability of Ca²⁺ in a time-dependent manner that interferes with the material's potential to induce osteogenesis^{9,10}. The results of our study, especially the osteogenic marker expression pattern and ALP activity, indicated an intermediate to advanced phase of osteoblastic differentiation in the NeoMTA-P, ProRoot, Bio-C, MTA-HP, and PBS-HP groups. These materials seemed to favor an immediate osteogenic effect on osteoblastic cells at the expense of cell migration, which corroborates the wound healing results. In contrast, the Biodentine group exhibited a pattern of initial osteoblast differentiation.

The mineralization potential of the osteoblastic cells after 15 days of exposure to NeoMTA-P, ProRoot, Bio-C, MTA-HP, and PBS-HP was consistent with the intermediate/late phases of differentiation. The presence of mineralization nodules stained with alizarin red in those groups was extensive. The ARS-stained areas were significantly higher in the NeoMTA-P, ProRoot, Bio-C, MTA-HP, and PBS-HP groups. The osteoblastic cells exposed to Biodentine had no differential pattern of mineralization when compared to the unexposed cells (CT). This result is consistent with the Biodentine early phase of differentiation, gene expression, and alkaline phosphatase activity. Saos-2 cells exposed to Biodentine and ProRoot in this study showed a different result than what was observed in human dental pulp cells in a different study⁹. Biodentine may be more suitable for pulp cells than for osteoblastic cells. After all, this material was developed to resemble dentine, the mineralized tissue surrounding the pulp cavity. It is important to remember that cells from diverse tissues present different characteristics, such as optimal stiffnesses, proliferation, calcium signaling responsiveness, and phases of differentiation. For example, a higher pH is the ideal environment for osteoblastic cells¹¹. Tricalcium silicate-based cements are recognized for their high release of OH⁻, causing the environmental pH to increase¹⁰. The setting time can also explain the different results; we allowed the materials to set for 24 h before cell exposure, while in the dental pulp cell study, Biodentine and ProRoot were set for 3 h⁹. Complete setting and less toxic compound release could explain the best results from ProRoot in osteoblastic cells. A recent study evaluated ProRoot and Biodentine in the dental pulp of Wistar rats³¹. Their results showed that both materials presented a slight and reversible inflammatory reaction in the dental pulp. The authors also noticed an exacerbated induction of mineralization with Biodentine

Brand	Formulation	Initial setting time (min)	Composition	Manufacturer
ProRoot MTA	Powder-liquid	165	Powder: bismuth oxide, tricalcium silicate, dicalcium silicate, calcium dialuminate, and calcium sulfate. Liquid: sterile distilled water*	Dentsply Sirona Tulsa, OK, USA
Bio-C Repair	“Ready-to-use”	40	Calcium silicates, calcium aluminate, calcium oxide, zirconium oxide, iron oxide, silicon dioxide, and dispersing agent*	Angelus Londrina, PR, Brazil
PBS HP	Powder-liquid	5	Powder: calcium oxide, calcium carbonate, magnesium oxide, dicalcium silicate, aluminum oxide, sodium oxide, potassium oxide, and pozzolan (high level of silica oxide and aluminum highly reactive with calcium hydroxide). Liquid: distilled water*	CIMMO MJS Ltda Pouso, Alegre-MG Brazil
Biodentine	Powder-liquid	12	Powder: tricalcium silicate, zirconia oxide, calcium oxide, calcium carbonate, yellow and red pigment, brown iron oxide. Liquid: calcium chloride dihydrate, purified water*	Septodont Saint-Maur-des-Fossés, France
NeoMTA Plus	Powder-gel	< 60	Powder: tricalcium silicate, dicalcium silicate, tantalum oxide, tricalcium aluminate, calcium sulfate, and plaster. Liquid: water-based gel and thickening agents and water-soluble polymers*	Avalon Biomed Houston, TX, USA
MTA Repair HP	Powder-liquid	15	Powder: tricalcium silicate, dicalcium silicate, tricalcium aluminate, calcium oxide, calcium tungstate. Liquid: water and plasticizer*	Angelus Londrina, PR, Brazil

Table 1. Endodontic cement specifications. *Manufacturer information.

and argued that the use of this material could lead to the formation of pulp calcifications, which would be undesirable for regenerative endodontic treatment.

In conclusion, the potential among the calcium silicate materials in this study to induce osteogenesis was diverse. These materials seemed to induce different phases of cellular differentiation. The compounds released from the reparative cements probably created an environment rich in calcium ions, silica, and hydroxides that caused environmental stiffness around the osteoblastic cells, especially during the first 24 h of exposure. We believe that cement that immediately induces osteoblast differentiation is ideal for reparative and regenerative treatments because it would quickly stimulate a mineralized barrier. For instance, NeoMTA-P, Bio-C, PBS-HP, ProRoot, and MTA-HP would be more suitable for root canal perforations and apical surgeries. Cells exposed to Bio-C, PBS-HP, ProRoot, NeoMTA-P, and MTA-HP seemed to achieve advanced or intermediate phases of differentiation more quickly than those exposed to Biodentine. Biodentine may be more appropriate as a dentine substitute for indirect or direct pulp treatment. Particularly in pulp revascularization treatment, the new dentin bridge induced by the cement will favor pulp-like tissue regeneration underneath. Therefore, a cement with a higher potential to induce osteogenesis could be more attractive in regenerative endodontics; this hypothesis should inspire further evaluation in a clinical trial. Considering the putty formulation of Bio-C and the biological properties required for an endodontic reparative material, Bio-C and PBS-HP can be suitable options for ProRoot, MTA-HP, Biodentine, and NeoMTA-P. Several types of endodontic cements based on calcium silicate are available; each has a different composition and biological potential. The thought of adopting just one of them to use in all reparative or regenerative endodontics might be a mistake. After all, one cement has a better antibacterial effect while another can more effectively induce the differentiation of osteoblasts than the differentiation of pulp stem cells. This study can be a breakthrough in current clinical therapeutics for reparative endodontic treatments.

Methods

Culture of Saos-2 cells. Saos-2 human osteoblastic cells (ATCC HTB-85), a model of osteogenesis, were cultured as a monolayer in T-75 flasks (Corning, Union City, CA, USA) containing Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100 µg/mL) at 37 °C, 95% humidity, and 5% CO₂ (all supplements, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA). After detaching with trypsin/EDTA (0.25%), Saos-2 cells were seeded at a density of 2×10^4 /well in 12-well plates (Corning, Union City, CA, USA) and cultured under the same conditions until adherence. The cells were then exposed to the cement samples in Transwells (0.4 µm permeable membranes, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) for further experiments. Unexposed cells were the control group (CT). The experiments were repeated independently three times (n = 9/group). For the alizarin red staining (ARS) assay, the cells were exposed or not (CT) to the test materials in osteogenic media under the same conditions described above (osteogenic media: DMEM, 10% FBS, 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 0.0023 g/mL β-glycerophosphate, 0.055 mg/mL L-ascorbate; Sigma Chemicals, St Louis, MO).

Samples of endodontic cement. Bio-C, Biodentine, PBS-HP, MTA-HP, ProRoot, NeoMTA-P (Table 1), and zinc oxide-eugenol cement (ZOE, a negative control) were prepared according to the manufacturer's recommendations under sterile conditions. The cement samples were placed in polypropylene molds (3 × 5 mm) and incubated for 24 h at 37 °C, 95% humidity, and 5% CO₂ for complete setting before the experiment. They were then removed from the molds and placed in the Transwell inserts for exposure to Saos-2 cells in 12-well plates.

MTT assay. After 24 h of exposure to the cement pellets, the medium was replaced by DMEM without FBS containing 0.55 mg/mL MTT (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA). The plates were incubated for an additional 4 h under the same conditions already described to allow the mitochondrial dehydrogenases of viable cells to transform the yellow MTT salt into purple formazan crystals. After that, each well was washed with 1 mL of

phosphate buffer (PBS 1×), and the formazan was solubilized with 500 µL of acidic isopropyl alcohol (isopropyl alcohol with 0.04 N HCl). A total of 100 µL from each sample was transferred to 96-well plates, and the optical density at 590 nm (OD 590 nm) of each well was measured with a microplate reader (SpectraMax M3, Molecular Devices, San Jose, California, USA). The viability rates of the cells exposed to the cement samples and the control group were calculated according to the following formula: viability rate = (OD of the sample × 100)/OD of CT.

Wound healing. When the Saos-2 cells were 95% confluent, we made a 500 µm wide wound at the bottom of each well in 12-well plates, and the medium was renewed. The experiment was performed in triplicate for cell exposure to each cement sample in Transwell inserts and was repeated three times independently. A total of 30 fields were photographed per group using an Axio Observer Z1 microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). Digital images were taken at different exposure times: 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h. The microscopic images (n = 30/group) were processed using ImageJ 1.52K Software (National Institutes of Health, NIH, Bethesda, Maryland, USA). The cell covered area (%) was calculated with ImageJ following the equation: $A(\%) = \frac{A_c \times 100}{A_g}$, where A_c is the cell covered area of the gap and A_g is the total area of the gap. The migration rate (µm/h) was calculated as described by Jonkman et al.³². According to the authors, we first measured the gap area for each frame in the wound healing experiment and then plotted the gap area as a function of time, deriving the cell migration rate (V_m) and the time in hours (h) to close half of the gap (t1/2 gap). We obtained a general equation for a line, in which the intercept is the gap area at the start of the experiment. The cell sheet migration rate (V_m) is the average velocity at which the cells collectively move into the gap created in the wound healing assay. The slope is equal to dA/dt , where the area A (µm²) is the width of the gap (w) times the length of the gap (l). Assuming that the gap is much longer than the field of view so that the cells do not migrate from the edges, the length is constant.³² Considering that the width closes at twice the rate of cell migration, this gives a cell migration rate of $V_m = \frac{|\text{slope}|}{2l} = \frac{|dA/dt|}{2l}$.

Real-time PCR (qPCR). The same cells observed in the wound healing assay were collected in TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) after 96 h of exposure. Total RNA was extracted according to the TRIzol manufacturer's instructions. From each sample, 2 µg of RNA was reverse transcribed in cDNA (QuantiTect Kit, Qiagen, Hilden, Germany) and used as a template for real-time PCR (qPCR) to evaluate the osteogenesis markers bone sialoprotein or secreted phosphoprotein 1 (*BNSP*), alkaline phosphatase (*ALPL*) and osteocalcin or bone gamma-carboxylglutamate protein (*BGLAP*). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) was the reference gene. The reactions were carried out in a Rotor-Gene Q system (Qiagen, Hilden, Germany) and included SYBR-Green PCR Master Mix 1X (Bio-Rad, Hercules, California, USA), 100 ng of cDNA, and 0.25 µM of each forward and reverse primer (Exxtend, Paulinia, SP, Brazil) in a final volume of 20 µL. Thermal cycle conditions: 95 °C for 5 min, 40 cycles of denaturation at 95 °C for 5 s and priming, synthesis plus fluorescence reading at 60 °C for 15 s. The fold change in expression followed the $\Delta\Delta C_t$ method ($\text{fold} = 2^{-(\Delta\Delta C_t \pm \text{stdv})}$). The forward primer (FP) and reverse primer (RP) were *BNSP* (L24757.1), FP = 5'TGCATC GAAGAGTCAAAAATAGAGG3' and RP = 5'GAGGATAAAAGTAGGCATGCTTG3'; *BGLAP* (NM_199173), FP = 5'CAGCGAGGTAGTGAAGAGAC3' and RP = 5'TGCTTGGACACAAAGGCTG3';

ALPL (NM_000478.4), FP = 5'AAGCACTCCCCTTCATCTG3' and RP = 5'TTGTTCTGTTTCAGCTCG TAC3'; and *GAPDH* (NG_007073), FP = 5'TGAAGGTCGGAGTCAACG3' and RP = 5'TGGGTGGAATCATAT TGGAAC3'.

Alkaline phosphatase activity. The enzymatic activity of alkaline phosphatase (ALP) was evaluated using a colorimetric kit (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil) as described in a different study³³. Briefly, after 5 days of exposure, Saos-2 cells were immersed in 500 µL of sodium lauryl sulfate (1 mg/mL, Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) for 30 min at room temperature, and 50 µL of sample from each group was added to the kit components according to the manufacturer's instructions. The absorbance (OD = 570 nm) was measured with a microplate reader (SpectraMax M3, Molecular Devices, San Jose, California, USA). The ALP activity was expressed as µmol of thymolphthalein/min/L/OD of viable cells for normalization³³.

Alizarin red staining (ARS). After 15 days of cell exposure to the cements in osteogenic media (n = 6/group), the culture wells were washed three times for 5 min each with 1× PBS and fixed in 10% (v/v) formaldehyde (Sigma) at room temperature for 15 min. The monolayers were then washed twice with sterile distilled water (dH₂O) for 5 min each time. After that, 1 mL of 2% ARS, pH 4.1 (Sigma) per well was added to the plate wells, and the samples were incubated again at room temperature for 20 min to expose the mineralized nodules to the dye. The wells were finally washed three times with 2 mL of dH₂O. The stained fields were observed using an inverted microscope (Axiovert 100, Carl Zeiss, Jena, Germany) at 40× magnification and photographed. The digital images were processed using ImageJ 1.45 software (National Institutes of Health, NIH, USA), and the percentage of stained area was calculated according to ImageJ guidelines. Briefly, all images were converted to RGB (red, green, blue), the threshold of the red channel was adjusted in ImageJ taking the images of the CT (control) as a parameter, and the percentage of stained area in all groups were measured under the previously defined threshold (n = 12 images/group).

Statistical analysis. The MTT, ALP, qPCR, and wound healing assays and ARS data were tested for normal distribution using the Shapiro–Wilk W test (sample sizes between 3 and 2000). All data presented a normal distribution. MTT, ALP, qPCR, and ARS data were then subjected to one-way ANOVA, and the wound healing data to two-way ANOVA, where the response variable was migration rate, and the two factors were time and the material group. Sample size calculations were established using the means and within-group variance based on

results from other studies^{11,17}, with an alpha of 5% and 80% power (“F test for group effect” and “F test for row effect”, considering one-way ANOVA and two-way ANOVA, respectively). Differences between groups were established with Bonferroni’s posttest for all variance analysis, with $p < 0.05$ (all in Stata/IC 15.1, StataCorp, College Station, TX, USA).

Ethical approval. This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Informed consent. For this type of study, formal consent was not required.

Received: 4 April 2021; Accepted: 9 August 2021

Published online: 18 August 2021

References

1. Torabinejad, M. *et al.* Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *J. Endod.* **23**, 225–228 (1997).
2. Daoudi, M. F. & Saunders, W. P. In vitro evaluation of furcal perforation repair using mineral trioxide aggregate or resin modified glass ionomer cement with and without the use of the operating microscope. *J. Endod.* **28**, 512–515 (2002).
3. Souza, N. J., Justo, G. Z., Oliveira, C. R., Haun, M. & Bincoletto, C. Cytotoxicity of materials used in perforation repair tested using the V79 fibroblast cell line and the granulocyte-macrophage progenitor cells. *Int. Endod. J.* **39**, 40–47 (2006).
4. Camilleri, J., Cutajar, A. & Mallia, B. Hydration characteristics of zirconium oxide replaced Portland cement for use as a root-end filling material. *Dent. Mater. J.* **27**, 845–854 (2011).
5. Duarte, M. A. H. *et al.* Tricalcium silicate-based cements: Properties and modifications. *Braz. Oral Res.* **32**, 111–118 (2018).
6. Da Fonseca, T. S. *et al.* Biodentine and MTA modulate immunoinflammatory response favoring bone formation in sealing of furcation perforations in rat molars. *Clin. Oral Investig.* **23**, 1237–1252 (2019).
7. Zhang, W., Li, Z. & Peng, B. Assessment of a new root canal sealer’s apical sealing ability. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **107**, 79–82 (2009).
8. Best, S. M., Porter, A. E., Thian, E. S. & Huang, J. Bioceramics: Past, present and for the future. *J. Eur. Ceram. Soc.* **28**, 1319–1327 (2009).
9. Rathinam, E. *et al.* The calcium dynamics of human dental pulp stem cells stimulated with tricalcium silicate-based cements determine their differentiation and mineralization outcome. *Sci. Rep.* **11**(1), 645 (2021).
10. Koutroulis, A., Kuehne, S. A., Cooper, P. R. & Camilleri, J. The role of calcium ion release on biocompatibility and antimicrobial properties of hydraulic cements. *Sci. Rep.* **9**(1), 19019 (2019).
11. Gomes-Cornélio, A. L. *et al.* Bioactivity of MTA plus, Biodentine and an experimental calcium silicate-based cement on human osteoblast-like cells. *Int. Endod. J.* **50**, 39–47 (2015).
12. Tomás-Catalá, C. J. *et al.* Biocompatibility of new pulp-capping materials NeoMTA plus, MTA repair HP, and Biodentine on human dental pulp stem cells. *J. Endod.* **44**, 126–132 (2018).
13. Escobar-García, D. M., Aguirre-López, E., Méndez-González, V. & Pozos-Guillén, A. Cytotoxicity and initial biocompatibility of endodontic biomaterials (MTA and Biodentine™) used as root-end filling materials. *Biomed. Res. Int.* **20**, 1–7 (2016).
14. Jiménez-Sánchez, M. D. C., Segura-Egea, J. J. & Díaz-Cuenca, A. Higher hydration performance and bioactive response of the new endodontic bioactive cement MTA HP repair compared with ProRoot MTA white and NeoMTA plus. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **107**, 2109–2120 (2019).
15. Zerbinatti, C. C. *et al.* Bioceramic cement in the filling of bone defects in rats. *Acta Cir. Bras.* **34**, 1–7 (2019).
16. McQuillan, D. J., Richardson, M. D. & Bateman, J. F. Matrix deposition by a calcifying human osteogenic sarcoma cell line (SAOS-2). *Bone* **16**, 415–426 (1995).
17. Salles, L. P. *et al.* Mineral trioxide aggregate-based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. *J. Endod.* **38**, 971–976 (2012).
18. Islam, I., Chng, H. K. & Yap, A. U. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement. *J. Endod.* **32**, 193–197 (2006).
19. Kowaltowski, A. J. *et al.* Mitochondrial morphology regulates organellar Ca²⁺ uptake and changes cellular Ca²⁺ homeostasis. *FASEB J.* **33**, 13176–13188 (2019).
20. Sequeira, D. B. *et al.* Effects of a new bioceramic material on human apical papilla cells. *J. Funct. Biomater.* **9**, 1–14 (2018).
21. Attik, G. N. *et al.* In vitro biocompatibility of a dentine substitute cement on human MG63 osteoblasts cells: Biodentine versus MTA. *Int. Endod. J.* **47**, 1133–1141 (2014).
22. Luo, Z. *et al.* Effect of biodentine on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. *J. Dent.* **24**, 490–497 (2014).
23. Tsai, C. L. *et al.* Mineral trioxide aggregate affects cell viability and induces apoptosis of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *BMC Pharmacol. Toxicol.* **19**, 1–10 (2018).
24. Kim, E. C. *et al.* Evaluation of the radiopacity and cytotoxicity of Portland cements containing bismuth oxide. *Oral. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **105**, 54–57 (2008).
25. Zhang, T. *et al.* Effect of matrix stiffness on osteoblast functionalization. *Cell Prolif.* **50**(3), 12338 (2017).
26. Bangasser, B. L. *et al.* Shifting the optimal stiffness for cell migration. *Nat. Commun.* **8**, 15313 (2017).
27. Zhang, D. & Kilian, K. A. The effect of mesenchymal stem cell shape on the maintenance of multipotency. *Biomaterials* **34**, 3962–3969 (2013).
28. Kim, J. M. *et al.* G protein-coupled calcium-sensing receptor is a crucial mediator of MTA-induced biological activities. *Biomaterials* **127**, 107–116 (2017).
29. Maeda, T. *et al.* Mineral trioxide aggregate induces osteoblastogenesis via Atf6. *Bone Rep.* **2**, 36–43 (2015).
30. Zoch, M. L., Clemens, T. L. & Riddle, R. C. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone* **82**, 42–49 (2016).
31. Paula, A. B. *et al.* Evaluation of dentinogenesis inducer biomaterials: An in vivo study. *J. Appl. Oral Sci.* **28**, e20190023 (2020).
32. Jonkman, J. E. N. *et al.* An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adh. Migr.* **8**, 440–451 (2014).
33. Rosa, A. L. & Beloti, M. M. Development of the osteoblast phenotype of serial cell subcultures from human bone marrow. *Braz. Dent. J.* **16**, 225–230 (2005).

Acknowledgements

The work was supported by CAPES (PROAP-DPG/UnB No 04/2018), Brazil.

Author contributions

M.C.S.: methodology; data curation; formal analysis; investigation; writing-original draft. A.L.G.C.: methodology; investigation; manuscript writing-review and editing. L.A.O.: conceptualization; resources; formal analysis; manuscript writing-review and editing. M.T.F.: methodology; formal analysis; manuscript writing-review and editing. L.P.S.: conceptualization; data curation; formal analysis; investigation; methodology; supervision; manuscript writing-review and editing.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to L.P.S.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021



Universidade de Brasília

Faculdade de Ciências da Saúde

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

Convidamos o(a) Senhor(a) a participar voluntariamente do projeto de pesquisa **Isolamento de células da polpa dentária humana para testes de bioatividade e biocompatibilidade de novos cimentos endodônticos e biopolímeros in vitro.** sob a responsabilidade dos pesquisadores Loise Pedrosa Salles e Marcos Coelho Santiago. O projeto agrega importante valor científico e biotecnológico aos resultados obtidos para a área de saúde, gerando benefícios para a população que necessita de tratamento endodôntico, formação acadêmica para o discente envolvido no projeto. Os resultados obtidos neste estudo devem auxiliar o profissional da área odontológica na escolha do material a ser utilizado na terapia endodôntica com base em evidências científicas.

O objetivo desta pesquisa é isolar e cultivar células da polpa dentária para testes de biocompatibilidade e bioatividade de material endodôntico. O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá sendo mantido o mais rigoroso sigilo pela omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a).

A sua participação se dará por meio de coleta de tecido pulpar proveniente do dente com indicação de remoção e que seria descartado, sem relação alguma com o procedimento cirúrgico realizado e não interferindo na recuperação, já que todo o procedimento é realizado no dente já fora da boca e que seria descartado. A coleta será realizada no dia da consulta cirúrgica sem necessidade nenhum tempo adicional e será realizada na própria clínica.

Esse estudo não oferece risco direto pois o sr.(a) será apenas concedente do dente extraído que seria material de descarte. Os riscos são os da própria extração dentária, por exemplo: sangramento, inflamação, dor, inchaço na região, dormência nos lábios ou língua, infecções. Para minimizar esses riscos serão realizados exames prévios, como hemograma e consulta clínica pré-operatória. O procedimento será realizado sob anestesia e sedação, se necessária. O sr.(a) será acompanhado após a cirurgia e receberá as devidas recomendações e medicação sistêmica com analgésicos, anti-inflamatórios e antibióticoterapia, quando necessário. Os pacientes concedentes receberão o benefício do tratamento cirúrgico e ortodôntico, instrução de higiene oral e profilaxias. Se você aceitar participar, estará contribuindo para alcançar estratégias de tratamento mais eficazes. O(a) Senhor(a) pode se recusar a responder (ou participar de qualquer procedimento) qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a). Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração. De acordo com o código de ética profissional será mantido o sigilo e confidencialidade dos seus dados envolvidos na pesquisa e informações do seu prontuário odontológico.

Como não será necessário nenhuma consulta adicional ou retorno, a concessão do material não gerará nenhum custo já que o material é considerado de descarte.

Caso haja algum dano direto ou indireto decorrente de sua participação na pesquisa, você deverá buscar ser indenizado, obedecendo-se as disposições legais vigentes no Brasil.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade de Brasília podendo ser publicados posteriormente. Os materiais serão utilizados somente para esta pesquisa e ficarão sob a guarda do pesquisador pelo período dos experimentos e serão inutilizados e descartado assim que os dados forem coletados.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Marcos Coelho Santiago (61) 984014301 ou Loise Pedrosa Salles, na Universidade de Brasília no telefone móvel (61) 9 96120115, disponível inclusive para ligação a cobrar, ou pelo e-mail marcoscsantiago1@gmail.com.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Saúde (CEP/FS-UnB) da Universidade de Brasília. O CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do participante da pesquisa podem ser esclarecidas pelo telefone (61) 984014301 ou pelo e-mail marcoscsantiago1@gmail.com. O CEP/FS se localiza na Faculdade de Ciências da Saúde, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Asa Norte.

Caso concorde em participar, pedimos que assine este documento que foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o Senhor (a).

Nome / assinatura

Pesquisador Responsável
Nome e assinatura

Brasília, 21 de outubro de 2022

UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Isolamento de células da polpa dentária humana para testes de bioatividade e biocompatibilidade de novos cimentos endodônticos e biopolímeros in vitro.

Pesquisador: LOISE PEDROSA SALLES

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 23852219.9.0000.0030

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.922.591

Apresentação do Projeto:

"Resumo:

O sistema de cultura de células da polpa dentária é interessante para a proliferação celular e uso em estudos para avaliação de biocompatibilidade e potencial bioativo de materiais odontológicos. As células da polpa dentária humana tem o potencial de diferenciação e produção de matriz extracelular mineralizável. O objetivo deste projeto é avaliar a biocompatibilidade e a bioatividade dos novos cimentos endodônticos biocerâmicos em cultura primária de células pulpares humanas. Após a aprovação em Comitê de Ética e mediante leitura e aceite formal do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), as células da polpa dentária serão isoladas de terceiros molares extraídos por indicação. Esses dentes são comumente considerados como material de descarte em clínicas particulares e podem ser concedidos por pacientes voluntários para a pesquisa. Dentes que apresentam rizogênese incompleta são os que oferecem maior probabilidade de sucesso no isolamento das células. O método de escolha para esse isolamento, pela sua simplicidade e objetividade, será por explante. Imediatamente após extração, os dentes serão colocados em meio de cultura Dulbecco modied Eagle medium (DMEM) com adição de 10% de soro fetal bovino, antimicótico e antibiótico para remoção do tecido pulpar e isolamento das células. As células serão mantidas em incubadora e subcultivadas duas vezes por semana a 37 ° C, 95% de humidade, 5% de CO 2. Em seguida, as células serão passadas para placas de 12 poços para posterior exposição aos materiais odontológicos para realização dos testes de viabilidade e

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

Continuação do Parecer: 3.922.591

bioatividade celular. Ao final, será realizada a análise estatística dos dados obtidos. Após os experimentos, as células serão inutilizadas por submersão em hipoclorito de sódio e posteriormente descartadas. Por serem células sensíveis em cultura, sua armazenagem se torna inviável, portanto, não serão submetidas a congelamento. Este projeto agrega importante valor científico e biotecnológico aos resultados obtidos para a área de saúde, gerando benefícios para a população que necessita de tratamento endodôntico, formação acadêmica para o discente envolvido no projeto. Os resultados obtidos neste estudo devem auxiliar o profissional da área odontológica na escolha do material a ser utilizado na terapia endodôntica com base em evidências científicas."

"Metodologia Proposta:

O projeto será submetido ao Comitê de Ética e após sua aprovação serão coletados tecidos pulpares de terceiros molares concedidos por pacientes adultos jovens (Idade entre 18 e 22), dessa forma, será feita a utilização de material que seria de descarte. Após a exodontia, o dente será mantido em meio de cultura contendo Dulbecco modied Eagle medium (DMEM), até que possa ser utilizado. Os pacientes serão informados e esclarecidos sobre a utilização do material concedido através dos termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Não serão utilizadas imagens dos pacientes voluntários para qualquer fim. Estes serão apenas concedentes dos tecidos pulpares. O tecido pulpar será seccionado sob uma placa em fragmentos menores com auxílio de uma lâmina de bisturi para que se obtenha explantes de células da polpa dentária que terão aproximadamente 1mm³ e serão acondicionados em meio suplementado com tripsina / EDTA (0,25%) e todo o conjunto será mantido sobre uma mesa aquecedora a 37° C por 2 minutos, em ambiente estéril e em fluxo laminar. As células serão cultivadas como cultura em monocamada em frascos T-75 (Corning, Union City, CA) contendo meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) , ampicilina (100 UI / mL), e estreptomicina (100 ug / ml) até à confluência. As células serão acondicionadas em incubadora e subcultivadas duas vezes por semana a 37 ° C, 95% de umidade, 5% de CO 2 (todas as soluções fornecidas por Gibco, Grand Island, NY). Células aderentes na fase de crescimento logarítmico serão destacadas por uma mistura de tripsina / EDTA (0,25%) a 37 ° C por 2 minutos. As células coletadas serão semeadas em placas de 12 poços (Corning COSTAR) a uma densidade de 2 × 10 5por poço determinado por hemocitometria. Em seguida, as células ficarão incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente por 24 horas para obter crescimento exponencial de células antes da exposição ao cimento endodôntico. O meio de cultura será renovado a cada 3 dias. Após os experimentos, as

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

Continuação do Parecer: 3.922.591

células serão inutilizadas por submersão em hipoclorito de sódio e posteriormente descartadas. Por serem células de cultura primária, não imortalizadas como células de linhagem, o armazenamento ou criopreservação são inviáveis e não estão previstos nesse projeto. As amostras dos cimentos biocerâmicos e biopolímeros serão preparados conforme as recomendações dos fabricantes e em condições estéreis (fluxo laminar). Amostras dos cimentos serão acondicionadas em dispositivos do tipo transwell para exposição das células durante 1 semana para os diversos experimentos. Após esses procedimentos, as amostras serão submetidas ao teste de Viabilidade Celular, em que a proliferação celular será determinada pelo ensaio MTT, ao teste de Expressão Gênica por qPCR (real time PCR), a Atividade de Fosfatase Alcalina e a Mineralização e coloração com vermelho de alizarina S (ARS). Triplicatas serão preparadas para cada grupo teste e controle nos diferentes tempos de exposição. O experimento será repetido 2 vezes de forma independente (n = 6/grupo)."

"Critério de Inclusão:

Serão incluídos na pesquisa pacientes saudáveis de ambos os sexos, com idade de 18 a 22 anos, que possuam indicação de exodontia de terceiros molares por razões ortodônticas."

Objetivo da Pesquisa:

"Objetivo Primário:

O objetivo primário deste projeto é isolar células da polpa dentária para testes de biocompatibilidade e o potencial bioativo de material endodôntico."

"Objetivo Secundário:

Investigar a biocompatibilidade e bioatividade do novo material endodôntico."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

"Riscos:

O presente estudo não apresenta risco direto aos pacientes pois os mesmos são concedentes de dentes extraídos que serão utilizados na pesquisa (material de descarte). Ou seja, não serão realizados testes ou experimentações diretamente nos pacientes. Os riscos são inerentes ao tratamento odontológico que já seriam submetidos por indicação ortodôntica, independente da pesquisa (Exodontia de terceiros molares). Os riscos da cirurgia são hemorragias, alveolites, dor, edema e trismo, injúria ao nervo alveolar inferior, infecções abrangendo espaços faciais, injúrias em dentes adjacentes, fratura óssea da tuberosidade maxilar e/ou da mandíbula, comunicações bucossinusais e problemas periodontais em dentes vizinhos. Para minimizar esses riscos serão

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

Continuação do Parecer: 3.922.591

realizados exames prévios, como hemograma e consulta clínica pré-operatória. O procedimento será realizado sob anestesia e sedação, se necessária. O paciente será acompanhado no pós-cirúrgico e receberá as devidas recomendações pós-operatórias e medicação sistêmica com analgésicos, antiinflamatórios e antibióticoterapia, quando necessária."

"Benefícios:

A pesquisa trará o benefício do grande valor científico dos conhecimentos obtidos para a endodontia, especificamente: A utilização nos pacientes de material odontológico com maior biocompatibilidade e potencial de reparo de tecidos mineralizados. Para os pacientes concedentes será oferecido o benefício do tratamento cirúrgico e ortodôntico, instrução de higiene oral e profilaxias. De maneira geral este projeto irá gerar conhecimento e formação acadêmica para os discentes envolvidos e auxiliar o profissional da área odontológica na escolha do material a ser utilizado na terapia endodôntica com base em evidências científicas."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de mestrado do Departamento de Odontologia, Programa de Pós-graduação em Odontologia, sob orientação da pesquisadora principal e que será realizado pelo discente Marcos Coelho Santiago.

Cronograma informa etapa de "Coleta da polpa dentária e experimentos" em março de 2020.

Orçamento no valor total de R\$ 6.700,00, consistindo de material de custeio.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos acrescentados ao processo e analisados para emissão deste parecer:

1. Informações Básicas do Projeto - "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1434512.pdf", postado em 09/02/2020.
2. Carta de respostas às pendências apontadas no Parecer Consubstanciado No. 3.813.014, detalhando as alterações realizadas - "cartarespostacep2.docx", postado em 09/02/2020.
3. Cronograma - versão editável em "cronogramaCEP.docx" e versão não editável em "cronogramaCEP.pdf", postados em 09/02/2020.
4. Projeto Detalhado - versão editável em "projetodetalhadocep.docx" e versão não editável em "projetodetalhadocep.pdf", postados em 28/01/2020.

Recomendações:

Não se aplicam.

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

Continuação do Parecer: 3.922.591

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise das respostas às pendências apontadas no Parecer Consubstanciado No. 3.699.466 e 3.813.014:

1. Solicita-se rever os critérios de exclusão. Para o participante de pesquisa ser excluído, ele deverá ter sido primeiramente incluído. Realizar a alteração no projeto da Plataforma Brasil (PB) e no Projeto de pesquisa detalhado.

RESPOSTA: Em relação aos critérios de exclusão. Alteração: foi alterado para "Não se aplica" devido as características do projeto de pesquisa. Os pacientes são concedentes de material que será utilizado no projeto, ou seja, sua participação será imediata após o consentimento obtido na sessão cirúrgica. Portanto, nenhum paciente uma vez incluído como concedente de terceiros molares será excluído.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

2. Solicita-se atualizar o cronograma prevendo o início da pesquisa para período posterior à aprovação pelo CEP. Ressalta-se que cabe ao pesquisador responsável aguardar a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa (Res. CNS 466/2012, item XI.2.a). Realizar a alteração em todos os documentos pertinentes.

RESPOSTA: Atualização do cronograma: O cronograma foi atualizado para início em janeiro de 2020 na plataforma Brasil e no arquivo "cronogramaalterado".

ANÁLISE: O documento "Cronogramaalterado.pdf", postado em 15/11/2019, e o cronograma apresentado na Plataforma Brasil foram adequados, mas estão divergentes. Solicita-se uniformização. PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA

RESPOSTA: Atualização do cronograma: O cronograma foi atualizado para março de 2020 na plataforma Brasil e no arquivo "cronogramaalterado".

ANÁLISE: O documento "Cronogramaalterado.pdf", postado em 09/02/2020, e o cronograma apresentado na Plataforma Brasil foram adequados. PENDÊNCIA ATENDIDA

3. Os termos "doador", "doar", "doação" devem ser substituídos pelos termos "concessão", "conceder" e "concedente", visto que a propriedade do material biológico é sempre do participante de pesquisa. Solicita-se adequação. Realizar as alterações no projeto da PB, Projeto detalhado e modelo de TCLE.

RESPOSTA: Alteração realizada no item 5 (outras informações) no site da plataforma Brasil. Foram

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

Continuação do Parecer: 3.922.591

substituídos os termos "doador", "doar", "doação" por "concessão", "conceder" e "concedente". No projeto detalhado, item 7 (Metodologia), primeiro parágrafo, segunda linha, foi substituída a palavra "doados" por "concedidos". A última frase do primeiro parágrafo do item 7 (Metodologia) foi alterada para "Os pacientes serão informados e esclarecidos sobre a utilização do material concedido através dos termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e termo de cessão de uso de imagem para fins científicos e acadêmicos". Essa mesma alteração foi feita no campo "metodologia proposta" da plataforma Brasil. No parágrafo 5 do TCLE, a palavra "doação" foi substituída pela palavra "concessão". Na 11ª linha do resumo do projeto detalhado e no campo resumo da plataforma Brasil, a palavra "doados" foi substituída pela palavra "concedidos".

ANÁLISE: O documento "TCLEalterado.pdf", postado em 20/11/2019, foi adequado. Contudo, no projeto detalhado e no projeto da Plataforma Brasil ainda são mencionados os termos "doadores", "doador" e "doação". Solicita-se adequação. PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA

RESPOSTA: Alteração realizada no item 5 (outras informações) no site da plataforma Brasil. Foram substituídos os termos "doador", "doar", "doação" por "concessão", "conceder" e "concedente". No projeto detalhado, item 7 (Metodologia), primeiro parágrafo, segunda linha, foi substituída a palavra "doados" por "concedidos". A última frase do primeiro parágrafo do item 7 (Metodologia) foi alterada para "Os pacientes serão informados e esclarecidos sobre a utilização do material concedido através dos termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e termo de cessão de uso de imagem para fins científicos e acadêmicos". Essa mesma alteração foi feita no campo "metodologia proposta" da plataforma Brasil. No parágrafo 5 do TCLE, a palavra "doação" foi substituída pela palavra "concessão". Na 11ª linha do resumo do projeto detalhado e no campo resumo da plataforma Brasil, a palavra "doados" foi substituída pela palavra "concedidos".

ANÁLISE: O documento "TCLEalterado.pdf", postado em 20/11/2019, Projeto Detalhado - "projeto detalhado cep.docx", postado em 28/01/2020 e "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1434512.pdf". postado em 9/02/2020 estão adequados. PENDÊNCIA ATENDIDA

4. A pesquisadora informa que "O paciente receberá o benefício do tratamento odontológico que ele irá receber, ou seja, a exodontia dos terceiros molares.". Ainda quanto aos riscos, informa que "Não existe risco nenhum pois todo o procedimento é realizado após a cirurgia.". Considerando-se que conforme item V – DOS RISCOS E BENEFÍCIOS constante na Resolução CNS 466/2012, "Toda pesquisa com seres humanos envolve risco em tipos e gradações variados. Quanto maiores e mais

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

Continuação do Parecer: 3.922.591

evidentes os riscos, maiores devem ser os cuidados para minimizá-los e a proteção oferecida pelo Sistema CEP/CONEP aos participantes. Devem ser analisadas possibilidades de danos imediatos ou posteriores, no plano individual ou coletivo. A

análise de risco é componente imprescindível à análise ética, dela decorrendo o plano de monitoramento que deve ser oferecido pelo Sistema CEP/CONEP em cada caso específico.". Solicita-se apresentar análise de riscos e benefícios no projeto de pesquisa, no projeto da plataforma e no modelo de TCLE, bem como formas de minimizar os riscos. Considerar quebra de sigilo e confidencialidade.

RESPOSTA: Em relação aos riscos, foi alterado para: O presente estudo não apresenta risco direto aos pacientes pois os mesmos são concedentes de dentes extraídos que serão utilizados na pesquisa (material de descarte). Ou seja, não serão realizados testes ou experimentações diretamente nos pacientes. Os riscos são inerentes ao tratamento odontológico que já seriam submetidos por indicação ortodôntica, independente da pesquisa (Exodontia de terceiros molares). Os riscos da cirurgia são hemorragias, alveolites, dor, edema e trismo, injúria ao nervo alveolar inferior, infecções abrangendo espaços fasciais, injúrias em dentes adjacentes, fratura óssea da tuberosidade maxilar e/ou da mandíbula, comunicações bucossinusais e problemas periodontais em dentes vizinhos. Para minimizar esses riscos serão realizados exames prévios, como hemograma e consulta clínica préoperatória. O procedimento será realizado sob anestesia e sedação, se necessário. O paciente será acompanhado no pós-cirúrgico e receberá as devidas recomendações pós-operatórias e medicação sistêmica com analgésicos, antiinflamatórios e antibióticoterapia, quando necessário. Em relação aos benefícios, foi alterado para: A pesquisa trará o benefício do grande valor científico dos conhecimentos obtidos para a endodontia, especificamente: A utilização nos pacientes de material odontológico com maior biocompatibilidade e potencial de reparo de tecidos mineralizados. Para os pacientes concedentes será oferecido o benefício do tratamento cirúrgico e ortodôntico, instrução de higiene oral e profilaxias. De maneira geral este projeto irá gerar conhecimento e formação acadêmica para os discentes envolvidos e auxiliar o profissional da área odontológica na escolha do material a ser utilizado na terapia endodôntica com base em evidências científicas. Alteração realizada no item 4 (detalhamento do estudo) no site da plataforma Brasil.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

5. Solicita-se correção da folha de rosto, visto não existir Faculdade de Odontologia, mas somente Departamento de Odontologia na FacuLdade de Ciências da Saúde.

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

Continuação do Parecer: 3.922.591

RESPOSTA: Foi alterado na folha de rosto e substituído “Faculdade de Odontologia” para “Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília”. Alteração realizada no item 4 (detalhamento do estudo) no site da plataforma Brasil. A nova folha rosto foi anexada novamente com nome do arquivo “folhaderostoalterada”.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

Todas as pendências foram atendidas.

Não há óbices éticos para a realização do presente protocolo de pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme Resolução CNS 466/2012, itens X.1.- 3.b. e XI.2.d, e Resolução CNS 510/2016, Art. 28, inc. V, os pesquisadores responsáveis deverão apresentar relatórios parcial semestral e final do projeto de pesquisa, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1434512.pdf	09/02/2020 10:47:40		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	cartarespostacep2.docx	09/02/2020 10:47:25	MARCOS COELHO SANTIAGO	Aceito
Cronograma	cronogramaCEP.docx	09/02/2020 10:42:04	MARCOS COELHO SANTIAGO	Aceito
Cronograma	cronogramaCEP.pdf	09/02/2020 10:41:51	MARCOS COELHO SANTIAGO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodetalhadocep.docx	28/01/2020 19:33:16	MARCOS COELHO SANTIAGO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodetalhadocep.pdf	28/01/2020 19:32:38	MARCOS COELHO SANTIAGO	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoalterada.pdf	24/11/2019 18:37:48	MARCOS COELHO SANTIAGO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEalterado.docx	20/11/2019 20:20:10	MARCOS COELHO SANTIAGO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEalterado.pdf	20/11/2019 20:19:36	MARCOS COELHO SANTIAGO	Aceito

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 3.922.591

Orçamento	Orcamentopdf.pdf	20/10/2019 00:10:44	MARCOS COELHO SANTIAGO	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	20/10/2019 00:08:13	MARCOS COELHO SANTIAGO	Aceito
Outros	curriculobeatriz.pdf	20/10/2019 00:04:06	MARCOS COELHO SANTIAGO	Aceito
Outros	curriculolaudimar.pdf	20/10/2019 00:03:45	MARCOS COELHO SANTIAGO	Aceito
Outros	curriculomarcos.pdf	19/10/2019 23:55:15	MARCOS COELHO SANTIAGO	Aceito
Outros	curriculoloise.pdf	19/10/2019 23:54:29	MARCOS COELHO SANTIAGO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	termodeconcordanciacocepi.pdf	11/10/2019 11:19:41	MARCOS COELHO SANTIAGO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	termoconcordanciacepi.docx	10/10/2019 21:39:43	MARCOS COELHO SANTIAGO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	termoconcordanciafs.docx	10/10/2019 21:39:25	MARCOS COELHO SANTIAGO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termoresponsabilidadeWORD.docx	10/10/2019 21:37:57	MARCOS COELHO SANTIAGO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	cartaencaminhprojetoWORD.docx	10/10/2019 21:36:34	MARCOS COELHO SANTIAGO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	termodeconcordanciafs.pdf	10/10/2019 21:24:04	MARCOS COELHO SANTIAGO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termodereponsabilidade.pdf	10/10/2019 21:22:20	MARCOS COELHO SANTIAGO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	encaminhamento.pdf	10/10/2019 21:19:58	MARCOS COELHO SANTIAGO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 18 de Março de 2020

Assinado por:
Marie Togashi
(Coordenador(a))

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 3.922.591

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

FUNDING AND SUPPORT

This work was supported by the University of Brasília (PROAP/DGP), Brazil.